

**Zur Biogenese der Flavone und Anthocyanidine
von *Petunia hybrida* var. *nana***

Norbert Groll

1959

Zur Biogenese der Flavone und Anthocyanidine
von Petunia hybrida var. nana

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Norbert Groll

aus

Kassel

Juli 1959



1. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Hörhammer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.1959

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Allgemeiner Teil	2
I. Züchtung der Petunien	2
a) Vorarbeiten	2
b) Züchtung von reinen Linien	2
c) Auswahl der Petunia-nana-Typen für die chemischen Untersuchungen	5
II. Chemische Analyse	5
Bisherige Untersuchungen über das Vorkommen von Flavonen, Anthocyanen und phenolischen Pflanzensäuren in den Petunien	5
Eigene Untersuchungen	6
a) Qualitative Untersuchungen	6
1) Flavone	6
2) Anthocyane	12
3) Leucoanthocyane	16
4) Säuren	16
b) Quantitative Untersuchungen	24
c) Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse	29
d) Diskussion der Ergebnisse	30
C. Experimenteller Teil	35
I. Anzucht der Petunien	35
II. Papierchromatographie	35
III. Herstellung eines Rohextraktes	36
IV. Reinigung und Trennung der Flavonglykoside durch Säulenchromatographie	37
V. Identifizierung der Flavone	38
VI. Identifizierung der Anthocyanidine	40
VII. Prüfung auf Leucoanthocyane	41
VIII. Isolierung und Identifizierung der phenolischen Carbonsäuren .	42
IX. Nachweis der Aminosäuren	43
X. Methode der quantitativen Messungen	43

Farbfotos im Original !

A. Einleitung

Seit man die engen strukturellen Beziehungen der Flavonoide untereinander und zu den Phenylpropanabkömmlingen kennt, sind viele Untersuchungen durchgeführt und viele Theorien aufgestellt worden, um das Problem der Biosynthese der Flavone zu klären. Durch die Isotopentechnik sind innerhalb weniger Jahre bedeutende Ergebnisse erzielt worden. Trotzdem sind unsere Kenntnisse über den Reaktionsmechanismus im einzelnen noch sehr lückenhaft, da es bis vor kurzem noch keine exakten chemischen Untersuchungsmethoden gab, um die Vielzahl ähnlicher Verbindungen nebeneinander auch in kleinen Mengen quantitativ zu erfassen. Durch die Einführung der Papierchromatographie und spezieller Meßmethoden der Absorptionsspektren sind solche Möglichkeiten gegeben.

Für unsere Untersuchungen wählten wir Varietäten der *Petunia nana*, da diese Flavone und Anthocyane enthielten. Diese Wahl hatte noch ihren besonderen Grund in der leichten Züchtbarkeit, in dem für die Kreuzungsexperimente sehr günstigen Blütenbau, in den recht voluminösen Corollen - den eigentlichen Untersuchungsobjekten - und schließlich auch in der Tatsache, daß an dem Institut von Professor HARDER in Göttingen vor Jahren Petunien hinsichtlich der Ausbildung der Scheckungsmuster der Blüten und besonders auch der Entstehung der Anthocyane bereits untersucht worden waren ¹⁾).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Flavone und Anthocyane der *Petunia nana* kennenzulernen und festzustellen, wie weit solche Pflanzenstoffe vertreten sind, die als biosynthetische Vorstufen der Flavonoide in Frage kommen. Hierzu gehören vor allem die Leukoanthocyane, die cyclischen Pflanzensäuren und die Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin. Damit sollte eine quantitative Grundlage für spätere Isotopen-Versuche geschaffen werden. Die Frage, ob Flavonole im Laufe der Vegetation in Anthocyane umgewandelt werden können, wie dies I. STÖRMER und H. v. WITSCH ¹⁾ bei den Petunien festgestellt hatten, war zu prüfen.

¹⁾ I. STÖRMER u. H. v. WITSCH: *Planta* 27, 1-28 (1937)

B. Allgemeiner Teil

I. Züchtung der Petunien

a) Vorarbeiten

Um einen Überblick über die Inhaltsstoffe der Petunien zu bekommen, mußten zunächst Blüten verschiedener Varietäten und Arten chromatographisch geprüft werden. Im Gewächshaus wurden handelsübliche Petuniensamen der Arten *Petunia violacea* Lindl., *Petunia nyctaginiflora* Juss., *Petunia hybrida* var. *grandiflora* und *Petunia hybrida* var. *nana* ausgesät. Im Laufe der weiteren Untersuchungen zeigte sich, daß verschiedene Gartenvarietäten der *Petunia hybrida nana* für unsere Zwecke am geeignetsten waren. Die niedrige Wuchshöhe dieser Varietät, die verhältnismäßig großen Blüten und das Vorkommen von flavonfreien und flavonhaltigen bzw. anthocyanfreien und anthocyanhaltigen Blüten innerhalb dieses Typs waren die Gründe für unsere Wahl.

Bei der Elterngeneration der *Petunia hybrida nana* "WEISSE VARIETÄT" konnten wir schon zwei grundverschiedene Typen unterscheiden. Einige Pflanzen bildeten Corollen mit stark ausgeprägtem Flavongehalt, andere in der Farbe nicht unterscheidbare Pflanzen dagegen völlig flavonfreie Corollen. Papierchromatographische Untersuchungen ergaben, daß bei den flavonfreien Corollen einige im UV-Licht blau fluoreszierende Säuren kräftiger ausgebildet waren als bei den flavonhaltigen. Auch in der Blütenform und Blütengröße, in der Antheren- bzw. Pollenfarbe (weißlich, rein gelb, grünlichblau) und in morphologischen Merkmalen des Sprosses (Blattgröße, Stengeldicke) wurden Unterschiede festgestellt.

Die Gartenvarietät "WEISSE WOLKE" (W.W.) der *Petunia nana* bildete in der Elterngeneration eine einheitliche weiße Corollenfarbe. Die chromatographisch untersuchten Corollen enthielten kein Flavon. Wie bei den flavonfreien Corollen der "WEISSEN VARIETÄT" traten auch hier die im UV-Licht blau fluoreszierenden Säuren ziemlich stark auf. Morphologische Unterschiede zeigten sich in Blattform (glatter und welliger Blattrand) und in der Antherenfarbe (weißlich und rein gelb).

Die Varietät "HIMMELSKÖNIGIN" (him) blühte in der Elterngeneration einheitlich himbeerrot. Papierchromatographische Untersuchungen ergaben bei allen untersuchten Corollen einen einheitlichen Anthocyangehalt. Die Pflanzensäuren waren in der Varietät "HIMMELSKÖNIGIN" weniger stark konzentriert als in der Varietät "WEISSE WOLKE".

b) Züchtung von reinen Linien

Mehrere Pflanzen jeder Gruppe wurden sorgfältig geselbstet.

1) "WEISSE VARIETÄT"

Bis zur vierten Selbstungsgeneration zeigte die "WEISSE VARIETÄT" eine mannigfaltige Aufspaltung. Etwa zwölf verschiedene Formen ließen sich unterscheiden. Hellrosa bis dunkelrote aber auch streifig rot gemusterte Typen traten neben flavonfreien reinweißen und flavonhaltigen gelbweißen Blüten auf. In den rotgefärbten Blüten waren auch stets Flavone nachzuweisen. Genaue Prüfungen der flavonhaltigen, gelblichweißen Blüten ergaben, daß die Flavonglykoside nicht immer gleichmäßig über den ganzen Blütenteller verteilt waren, sondern auch Streifen und Muster bildeten, ganz ähnlich wie die Anthocyane. Durch Aufquetschen auf Chromatogrammpapier und Besprühen mit Aluminiumchlorid ließen sich die schon mit dem Auge erkennbaren Muster gut sichtbar machen.

Wegen der starken Spaltung der "WEISSEN VARIETÄT" wurden die Versuche, aus diesem Typ eine reine Linie zu züchten, aufgegeben.

2) "WEISSE WOLKE"

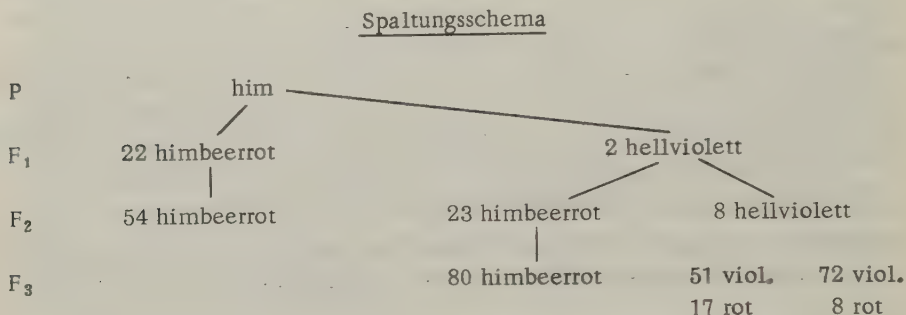
Da es uns nicht gelungen war, aus der "WEISSEN VARIETÄT" einen einheitlich blühenden Typ zu züchten, selbsteten wir die Blüten der "WEISSEN WOLKE", um eine rein weißblühende Linie zu erhalten.

Die F_1 -Generation dieses Typs blühte einheitlich weiß, zeigte jedoch wieder dieselben morphologischen Unterschiede wie die Elterngeneration. Von siebzig Pflanzen dieser ersten Filialgeneration zeigten zwei Individuen gelblichweiße Scheckungsareale in den Corollen. Eine chromatographische Untersuchung ergab, daß diese Blüten Flavone enthielten. Die F_2 -Generation der W.W. blühte mit 55 Pflanzen rein weiß, drei Pflanzen zeigten wiederum gelbe Flavonscheckungsareale, und eine Blüte hatte einen roten Anthocyanstreifen, die anderen Blüten derselben Pflanze blühten rein weiß. Die morphologischen Unterschiede traten auch in der F_2 -Generation wieder auf.

3) "HIMMELSKÖNIGIN"

Die Gartenvarietät "HIMMELSKÖNIGIN" zeigte in der F_2 -Generation 22 eltern-gleiche himbeerrotblühende Pflanzen (him/rot) und zwei Pflanzen, die mit einer erstmalig auftretenden hellvioletten Farbe blühten (him/viol.). Die beiden unter sich völlig gleichen violettblühenden Pflanzen wurden etwa doppelt so hoch wie die Stammformen, und ihre Blüten enthielten Flavone in viel größerer Konzentration als die himbeerroten Blüten. Him/rot und him/viol. wurden wiederum selbstet. Die Nachkommen von him/viol. spalteten in 23 himbeerrote und 8 violette Pflanzen (Spaltungsschema). Wenn dies eine Spaltung 3:1 nach dem Mendelschen Gesetz wäre, müßten die 8 violetten Pflanzen homozygot sein und ihre Nachkommen einheitlich blühen. Eine weitere Selbstungsgeneration zeigte jedoch

wieder eine Aufspaltung. In einem Fall blühten 72 Pflanzen violett und 8 himbeerrot, in einem anderen Fall 51 violett und 17 himbeerrot. Dagegen blühten die Nachkommen einer himbeerroten Blüte in der F_3 -Generation mit 80 Pflanzen einheitlich himbeerrot.



Die Spaltung in 51 violette und 17 rote entspricht wieder einem Verhältnis von 3:1. Nach dem Mendel'schen Spaltungsgesetz müßten die 17 rotblühenden Pflanzen erbrein sein, und von den 51 violetten müßten sich ebenfalls 17 reinerbig erweisen.

Wie oben erwähnt, enthalten die violetten Blüten viel mehr Flavon als die roten, jedoch in gleicher Ausprägung. Der unterschiedliche Gehalt war auf dem Chromatogramm klar zu erkennen.

W. SEYFFERT ²⁾ hatte bei Cyclamenblüten eine große Zahl sehr ähnlicher Farbtypen, deren Unterschiede mit dem Auge schwer zu erfassen waren, mit Hilfe der Papierchromatographie genau klassifizieren können. Durch die Untersuchung jeder einzelnen Pflanze einer Nachkommenschaft konnte er Fehlbonitierungen ausschalten und die Aufspaltung der in den Pigmentfaktoren heterozygoten Elternpflanze mit Hilfe der Chromatographie einwandfrei ermitteln.

Auch wir versuchten auf dem Weg der Papierchromatographie weiter zu kommen, einmal um Fehlbonitierungen auszuschalten und zweitens um gegebenenfalls unter den violetten Petunienblüten die homozygoten Formen herauszufinden. Es wurden daher 58 Pflanzen einzeln chromatographisch erfaßt. Alle rotblühenden, aber auch alle violettblühenden zeigten unter sich ein einheitliches Bild. Bei him/rot traten mehr rote Anthocyanflecke auf, der Flavongehalt war jedoch gegenüber him/viol. stark reduziert. Die in der sichtbaren Farbausprägung einheitlichen Formen ergaben also auch chromatographisch ein einheitliches Bild. Es war daher nicht möglich, auf dem Weg der Papierchromatographie eine weitere Differenzierung zu erreichen, wie es W. SEYFFERT bei seinen Objekten gelungen war.

²⁾ W. SEYFFERT: Z. indukt. Abstammungs- u. Vererbungslehre 87, 311 (1955)

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß wir durch unsere Züchtungsversuche nur die Petunia hybrida nana Typ HIMMELSKÖNIGIN rotblühend in erbreiner Form erhalten konnten. Der Typ HIMMELSKÖNIGIN violettblühend ist noch nicht reinerbig, da in der F₃-Generation wiederum eine Aufspaltung in rot- und violettblühende Pflanzen auftrat. Der Petunia nana Typ WEISSE WOLKE blühte zwar in allen gezüchteten Generationen einheitlich weiß, hinsichtlich der Pigmentfaktoren ist er jedoch nicht erbrein, denn immer wieder traten einzelne flavonhaltige Blüten auf.

c) Auswahl der Petunia nana Typen für die chemischen Untersuchungen

Für die chemischen Untersuchungen mußten wir möglichst solche Blütentypen auswählen, welche die zu isolierenden Stoffe in größter Konzentration enthielten.

Orientierende Vorversuche hatten ergeben, daß im Flavongehalt der Petunia nana Typen nur quantitative Unterschiede bestehen. Die violettblühende him/viol. enthielt zwar das meiste Flavon, doch war die Zahl der anfallenden Blüten zu gering, um daraus die Flavone isolieren oder identifizieren zu können. Daher wurden die Blüten aller flavonhaltigen Typen in Methanol gesammelt, um daraus die Flavone zu isolieren.

Zur Identifizierung der Antocyane mußte gegen Ende der vorliegenden Arbeit noch ein weiterer Typ der Petunia nana herangezogen werden. Die Konzentration der Anthocyane war in den Typen him/rot und him/viol. zu gering, um eine Identifizierung zu ermöglichen. Die tief violettblühende Gartenvarietät "RATS-HERR" (R.h.) der Petunia nana enthielt neben Flavonen genügend Anthocyane, um darüber einige Aussagen machen zu können.

Zur Aufklärung der phenolischen Pflanzensäuren wurde der Typ "WEISSE WOLKE" ausgewählt. W.W. enthielt diese Säuren in größter Menge, während Flavone und Anthocyane fehlten.

Für die quantitativen Bestimmungen wurden die Typen W.W. und R.h. wegen ihrer unterschiedlichen Inhaltsstoffe ausgewählt.

II. Chemische Analyse

Bisherige Untersuchungen über das Vorkommen von Flavonen, Anthocyanen und phenolischen Pflanzensäuren in den Petunien

I. STÖRMER und H.v. WITSCH³⁾, die chemische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen über das Blütenfarbmuster der Gartenpetunien anstellten, konnten zwar in den Petunienblüten Flavone und Flavonole nachweisen, sie aber nicht näher charakterisieren.

³⁾ I. STÖRMER u. H.v. WITSCH, Plante 27, 1-28 (1937)

E. MÜLLER ⁴⁾ hatte bei seinen papierchromatographischen Untersuchungen über das Vorkommen von Flavonen und cyclischen organischen Säuren in der Familie der Solanaceen in den Blüten von *Petunia nyctaginiflora* Quercetin, Kämpferol, Kaffeesäure und Chlorogensäure festgestellt.

Als Anthocyan der Petunien werden bei mehreren Autoren ^{5, 6, 7)} das Petunin (Petunidin-3,5-diglucosid) und auch andere Glykoside des Petunidins angegeben.

H. REZNIK ⁷⁾ untersuchte dunkelviolette Petalen einer *Petunia*-Hybride. Er fand neben drei Petunidinglykosiden ein Delphinidinglykosid, Rutin, ein Quercetinglykosid, ein unbekanntes hydrophiles Flavonglykosid, Chlorogensäure und eine unbekannte Pflanzensäure.

J. POLITIS ⁸⁾ stellte umfassende Untersuchungen über die Verbreitung der Chlorogensäure innerhalb der Solanaceen an, er fand in *Petunia nyctaginiflora* diese für die ganze Familie typische Pflanzensäure.

Eigene Untersuchungen

a) Qualitative Untersuchungen

1) Flavone

Isolierung der Flavone

Um genügend Material für die Isolierung der Flavone zu bekommen, wurden alle flavonhaltigen Petunienblüten während einer Vegetationsperiode in Methanol gesammelt. Hieraus stellten wir in üblicher Weise einen wässrigen Gesamtextrakt her und schüttelten ihn mit Äthylazetat aus. Der Destillationsrückstand der Äthylazetatausschüttelungen wurde in Methanol gelöst. Im Papierchromatogramm ließ dieser Rohextrakt neben vier im UV-Licht blau fluoreszierenden Flecken zwei braune Flecken erkennen, die Flavonglykosiden zuzuordnen waren. Die Abbildung 7 zeigt die Verteilung dieser Substanzen auf dem Chromatogramm (System: Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser).

⁴⁾ E. MÜLLER, Dissertation, München 1957

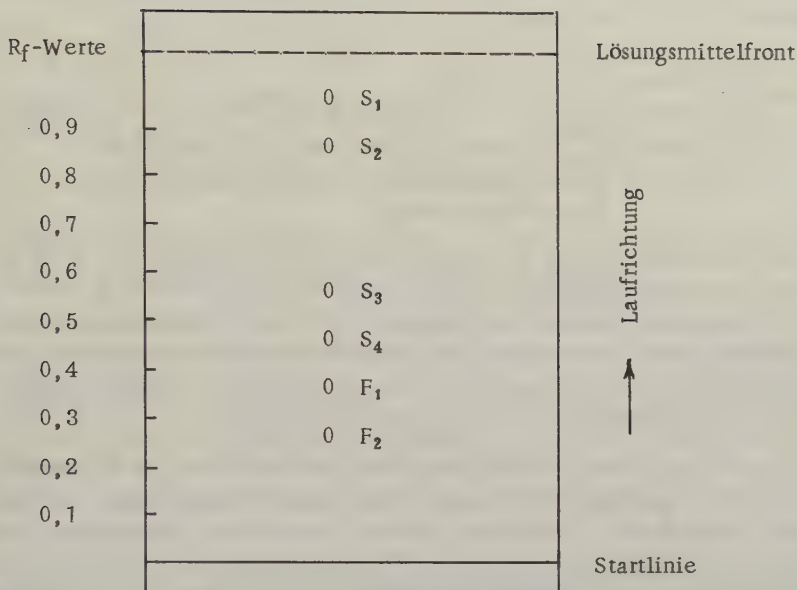
⁵⁾ R. WILLSTÄTTER u. BURDICK, Liebigs Ann. Chem. 412, 217 (1917)

⁶⁾ G. KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", Wien 1932, Bd. III/2, S. 987

⁷⁾ H. REZNIK, S.-B. Heidelberger Akad. Wiss. 125 (1956)

⁸⁾ J. POLITIS, ref. C. A. 42, 4648 (1948)

Abbildung 7



Alle Versuche, dieses Substanzgemisch weiter aufzutrennen, blieben zunächst erfolglos. Bei der fraktionierten Ausschüttelung mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln unterschieden sich die einzelnen Fraktionen lediglich in quantitativer, nicht aber in qualitativer Hinsicht. Versuche, über das Bleisalz zu einer einheitlichen Flavonlösung zu kommen, blieben ebenfalls ohne Erfolg. Trennungsversuche über Kieselgursäulen waren vergeblich. Die äthanolischen bzw. methanolischen Lösungen der verschiedenen Reinigungsversuche wurden, mit Wasser versetzt, zur Kristallisation aufgestellt. Es gelang aber in keinem Fall, ein Kristallisat zu erhalten, da die vielen Begleitstoffe die Kristallisation verhinderten.

W. LEEB⁹⁾ war es gelungen, bei der Isolierung des Adonivernithins einen reinen säulenchromatographischen Isolierungsgang zu finden. Er umging die Ausschüttelungen und isolierte mit Hilfe der Verteilungschromatographie über Zellosepulver und Perlon. Perlonpulver hatte ihm bei der Reinigung verunreinigter Flavonglykoside gute Dienste geleistet. Wir versuchten daher, für die Reinigung und Auftrennung der Flavonglykoside der Petunia einen ähnlichen Weg zu finden.

Der wäßrige Extrakt der Äthylazetatausschüttelungen wurde über eine Perlonsäule gegeben und mit viel Wasser klargewaschen. Als der Durchlauf nicht mehr gelb gefärbt war, eluierten wir mit Methanol bis zur Farblosigkeit. Obwohl im

⁹⁾ W. LEEB, Dissertation, München 1957

UV-Licht keine exakte Auftrennung in verschiedene Zonen zu erkennen war, fingen wir das Eluat fraktioniert auf und konnten in vier Fraktionen folgende Substanzen nachweisen:

- I. Fraktion: S_2 , S_2 , F_1 und F_2
- II. Fraktion: S_1 , S_2 , F_1 , F_2 und ein gelber Fleck in Kämpferolhöhe
- III. Fraktion: S_1 , S_2 und ein gelber Fleck in Kämpferolhöhe
- IV. Fraktion: S_1 , S_2 und zwei gelbe Flecken in Kämpferol- und Quercetinhöhe.

Durch diese Vorreinigung über Perlon wurden die Pflanzensäuren bis auf die zwei hochsitzenden ausgewaschen und die zwei Flavonglykoside in der ersten Fraktion konzentriert. Die in den Fraktionen II, III und IV auftretenden Flecke in Kämpferol- und Quercetinhöhe, die gelegentlich auch in anderen älteren Lösungen beobachtet wurden, entstehen vermutlich erst bei der Aufarbeitung des Extraktes durch Hydrolyse der Flavonglykoside F_1 und F_2 .

Die guten Ergebnisse, die L.HÖRHAMMER und Mitarbeiter ¹⁰⁾ und W.LEEB bei der Auftrennung von Flavonen mit sehr geringen R_f -Unterschieden auf der Zellulosesäule erzielt hatten, veranlaßten auch uns, zur weiteren Trennung der Flavonglykoside die Zellulosesäule heranzuziehen. Als Lösungsmittelsystem wurde wasser-gesättigtes Äthylazetat verwendet. Die Fraktion I, die wir bei der Reinigung aus der Perlonsäule erhalten hatten, wurde auf die Zellulosesäule aufgetragen. Unter dem UV-Licht konnten wir die Aufteilung in eine weit vorauswandernde blaue und zwei braun fluoreszierende Zonen verfolgen. Die chromatographische Untersuchung der fraktioniert aufgefangenen Zonen zeigte, daß eine vollständige Trennung der Flavonglykoside F_1 und F_2 erfolgt war.

Identifizierung der Flavone

Die erhaltenen Flavonlösungen waren chromatographisch rein, in ihrer Konzentration jedoch zu schwach, um daraus Kristallisate erhalten zu können.

Die papierchromatographischen Untersuchungen der Flavonglykoside F_1 und F_2 ergaben folgende R_f -Werte und Fluoreszenzfarben im UV-Licht:

¹⁰⁾ L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. F.GLOGGENGIESSER, Arch.Pharmaz. Ber.dtsch.parmaz.Ges. 291/63, 126 (1958)

Tabelle 1

Substanz	ÄAW *)	BEW *)	unbesprüht	mit Aluminium-sulfat	mit bas. Bleiazetat
Glykosid F ₁	0.34	0.47	braun	gelbgrün	gelbgrün
Glykosid F ₂	0.27	0.40	braun	gelbgrün	orange
Rutin	0.35	0.44	braun	gelbgrün	orange

Durch den WILLSTÄTTER-Reduktionstest ¹¹⁾ mit Magnesium und Salzsäure wurde der Flavonoidcharakter beider Substanzen sichergestellt.

Der Zirkon-Zitronensäure-Test nach L.HÖRHAMMER und R.HÄNSEL ¹²⁾ zeigte, daß es sich bei beiden Substanzen um Flavonol-3-glykoside handelt.

Nach L.H.BRIGGS und R.H.LOCKER ¹³⁾ bilden Flavonoide mit Eisenchlorid verschiedene, von ihrer Konstitution abhängige Farben. Flavonoide mit freier C₃-OH Gruppe ergeben eine Braunfärbung, mit freier C₅-OH Gruppe eine Grünfärbung. F₁ und F₂ ergaben beide Grünfärbung und besitzen demnach eine freie C₅-Hydroxygruppe.

Um festzustellen, ob es sich bei unseren Glykosiden um Mono-, Di- oder Polyglykoside handelt, wendeten wir die Anthronmethode nach R.DREYWOOD ¹⁴⁾ an. Nach dieser Probe müssen sowohl F₁ wie auch F₂ Diglykoside sein.

Nach der salzsauren Hydrolyse konnten papierchromatographisch folgende Substanzen nachgewiesen werden:

1. Glykosid F₁ : Kämpferol, Glukose und Galaktose,
2. Glykosid F₂ : Quercetin, Glukose und Galaktose.

Die Ergebnisse der Hydrolyse und die oben angeführten Farbreaktionen zeigen, daß

Glykosid F₁ ein Kämpferol-3-galaktoglukosid und

Glykosid F₂ ein Quercetin-3-galaktoglukosid ist.

*) ÄAW = Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser; 10+2+3;

BEW = Butanol-Eisessig-Wasser; 4+1+5.

¹¹⁾ R.WILLSTÄTTER u. H.MALLISON, S.B. preuß.Akad.Wiss., phys.math. Kl. 769 (1914)

¹²⁾ L.HÖRHAMMER u. R.HÄNSEL, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 284/56, 276 (1951)

¹³⁾ L.H.BRIGGS u. R.H.LOCKER, J.chem.Soc. (London) 3131 (1951)

¹⁴⁾ R.DREYWOOD, Ind.Engn.Chem., analyt.Edit. 18, 499 (1946)

Zur weiteren Sicherstellung der bisherigen Ergebnisse zogen wir absorptions-spektroskopische Untersuchungen heran.

Absorptionsspektroskopische Untersuchungen

α) Zur Identifizierung der Aglykone

Die UV-Absorptionsspektren von Flavonen und Flavonolen sind alle durch zwei Bänder maximaler Absorption in den Bereichen 330-380 mμ (Max_I) und 240-280 mμ (Max_{II}) charakterisiert. Der Abstand der beiden Absorptionsmaxima ist bei den Flavonolen grundsätzlich größer als bei den Flavonen¹⁵). Dazu kommt bei den Flavonolen im Bereich von 310 mμ ein meist nur wenig stark ausgeprägtes drittes Maximum. Durch diese beiden Unterschiede ist es möglich, an Hand des Absorptionsspektrums festzustellen, ob ein Flavonderivat mit oder ohne C₃-Hydroxyl vorliegt.

Die Lage der Absorptionsmaxima der Aglykone und Glykoside von F₁ und F₂ sind in Tabelle 2 mit denen von authentischem Kämpferol und Quercetin verglichen.

Tabelle 2

Substanz	Max _I	Max _{II}
Aglykon F ₁	367 mμ	266 mμ
authent. Kämpferol	367 mμ	266 mμ
Glykosid F ₁	348 mμ	266 mμ
Aglykon F ₂	373 mμ	266 mμ
authent. Quercetin	373 mμ	266 mμ
Glykosid F ₂	358 mμ	256 mμ

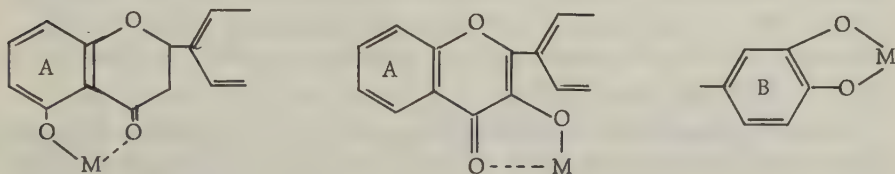
Die Tabelle zeigt, daß die Maxima des Aglykons F₁ mit denen des Kämpferols und die Maxima des Aglykons F₂ mit denen des Quercetins identisch waren. Ein drittes Maximum tritt zwar in den Absorptionsspektren der Glykoside F₁ und F₂ nicht auf, aber im Bereich um 310 mμ ergaben die Messungen konstante Werte.

β) Über die Zuckerstellung der einzelnen Glykoside

Während die Lage der Maxima für jedes Aglykon ein Charakteristikum darstellt, ist sie bei den Glykosiden von der Position des Zuckers am Aglykon abhängig. Die Normal-Spektren der Glykoside erlauben daher weder eine Aussage über das zugrundeliegende Aglykon noch über die Anknüpfungsstelle des Zuckers.

¹⁵) B. SKARZYNSKI, Biochem.Z. 301, 150 (1939)

T.B.GAGE und S.H.WENDER ¹⁶⁾ und J.B.HARBORNE ¹⁷⁾ schlagen daher vor, zur Analytik der Flavonglykoside die spektralen Verschiebungen nach Bildung von Metallkomplexen heranzuziehen. Es tritt dabei eine Chelatbildung ein, die folgende strukturellen Gruppierungen der Hydroxylgruppen voraussetzt:



Die Größe der Maximaverschiebung ist abhängig von der Stellung des Zuckers am Aglykon und von der Art des gebildeten Metallkomplexes.

Nach L.JURD und T.A.GEISSMAN ¹⁸⁾ tritt mit Aluminiumchlorid eine bathochrome Verschiebung ein, die auf Natriumazetatzusatz noch vergrößert wird. T.A.GEISSMAN und U.KRANEN-FIEDLER ¹⁹⁾ berichten über eine starke bathochrome Verschiebung der UV-Spektren von Flavonoiden mit freier C₇- und verglykosidierter C₄-Stellung im Natriumazetat-Milieu. Nach L.JURD ²⁰⁾ bilden nur zwei benachbarte Hydroxylgruppen mit Borsäure im Natriumazetat-Milieu Komplexe und daher tritt auch nur bei solchen Verbindungen eine bathochrome Verschiebung der Maxima auf. L.HÖRHAMMER und Mitarbeiter ²¹⁾ konnten nachweisen, daß diese Gesetzmäßigkeit auch für Flavonglykoside gültig ist.

Da unseres Wissens die Verschiebungen der Absorptionsspektren von Flavonylglykosiden noch nicht systematisch untersucht worden waren, haben wir einige uns zur Verfügung stehende Kämpferol- und Quercetinderivate mit Aluminiumchlorid, mit Natriumazetat, mit Aluminiumchlorid und Natriumazetat und mit Borsäure und Natriumazetat durchgemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 (S. 14) zusammengefaßt.

Mit Aluminiumchlorid trat eine sehr starke bathochrome Verschiebung der Hauptmaxima von Quercetin-3-galaktosid und Quercetin-3-rhamnoglucosid um 73 bzw. 70 mμ ein, die nach Natriumazetatzusatz noch verstärkt wurde. Die Verschiebung mit Aluminiumchlorid war bei Kämpferolglykosiden und bei

¹⁶⁾ T.B.GAGE u. S.H.WENDER, *Analytic.Chem.* **22**, 708 (1950)

¹⁷⁾ J.B.HARBORNE, *Chem. and Ind.* 1142 (1954)

¹⁸⁾ L.JURD u. T.A.GEISSMAN, *J.org.Chemistry* **21**, 1395 (1956)

¹⁹⁾ T.A.GEISSMAN u. U.KRANEN-FIEDLER, *Naturwissenschaften* **43**, 226 (1956)

²⁰⁾ L.JURD, *Arch.Biochem.Biophysics* **63**, 376 (1956)

²¹⁾ L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. F.GLOGGENGIESSER, *Arch.Pharmaz.*

Ber.dtsch.pharmaz.Ges. **291/63**, 126 (1958)

Quercetin-3-glykosiden um etwa 20 m μ schwächer. Das ist wohl damit zu erklären, daß diesen Verbindungen die Möglichkeit der Komplexbildung am B-Ring fehlt.

Die Messungen mit Borsäure im Natriumazetat-Milieu ergaben bei den Quercetin-3-glykosiden eine bathochrome Verschiebung von 18-20 m μ . Bei Quercetin-4'-glukosid und bei den Kämpferolglykosiden, also bei den Verbindungen, die keine freien benachbarten Hydroxylgruppen besitzen, bleibt eine starke Verschiebung aus.

Mit Natriumazetat wurden die Hauptmaxima der Quercetin-3-glykoside und des Kämpferol-3-glukosids um 30-40 m μ bathochrom verschoben. Bei Quercetin-4'-glukosid trat ebenfalls eine stärkere Verschiebung um 25 m μ ein. Dagegen blieb bei Kämpferol-3-robinosido-7-rhamnosid die Verschiebung fast ganz aus. Bei Kämpferol-3-rhamno-4'-arabinosid konnten wir ebenfalls nur eine ganz geringe Verschiebung von 8 m μ feststellen, während hier wie bei Quercetin-4'-glukosid etwa 25 m μ zu erwarten waren. Es ist daher anzunehmen, daß es sich bei dieser Verbindung nicht um ein Kämpferol-4'-glykosid sondern um ein 7-Glykosid handelt. *)

Bei der Messung des Absorptionsspektrums von Quercetin-4'-glukosid mit Aluminiumchlorid fiel uns auf, daß hier wie bei den Kämpferolderivaten ein drittes Maximum auftritt. Diese Tatsache ist vermutlich kein Charakteristikum der Kämpferolabkömmlinge, sondern weist wahrscheinlich auf das Vorhandensein nur einer freien Hydroxylgruppe im Seitenphenyl hin. H. REZNIK ²²⁾ konnte bei Apigeninverbindungen ein ähnliches Verhalten feststellen.

Vergleichen wir nun die Maximaverschiebungen der gemessenen Kämpferol- und Quercetin-Derivate mit denen von Glykosid F₁ und F₂, so können wir eine vollkommene Übereinstimmung mit Kämpferol-3-glukosid bzw. Quercetin-3-galaktosid und Quercetin-3-rhamnoglukosid feststellen. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits weiter oben geäußerte Annahme, daß es sich bei F₁ um ein Kämpferol-3-glykosid und bei F₂ um ein Quercetin-3-glykosid handeln muß.

2) Anthocyane

Methanolische Extrakte der rotblühenden Petunientypen zeigten auf dem Papierchromatogramm unter anderem zwei dunkelrote Anthocyanflecke (A₁ und A₂) mit folgenden R_F-Werten:

²²⁾ H. REZNIK, S.-B. Heidelberger Akad. Wiss., 125 (1956)

Tabelle 4

	BEW *)	ÄAW *)
A ₁	0.33	0.20
A ₂	0.21	0.05

Unter der UV-Lampe konnte man innerhalb dieser Flecke mehrere rote Färbungen erkennen, es waren also keine einheitlichen Substanzen. Wir ließen daher Chromatogramme 50 Stunden in BEW *) entwickeln, wobei sich die beiden Flecke in jeweils drei weitere aufteilten.

Die sechs Anthocyanglykoside durch die präparative Papierbogenmethode zu isolieren, mißlang, da die Konzentration der einzelnen Substanzen zu gering war.

Die Anthocyanidine bestimmten wir aus einem Rohextrakt dunkelviolettblühender Blüten. Aus dem wäßrigen Extrakt wurden die Flavone mit Äthylazetat ausgeschüttelt, dann mit Salzsäure hydrolysiert und die Anthocyane mit Isoamylalkohol aufgenommen.

Französischer Rotwein, der nach P.DUPUY und J.PUISAIS ²³⁾ Malvidin-, Petunidin- und Delphinidinglykoside enthält, wurde den gleichen Bedingungen unterworfen. Die Isoamylalkoholphasen, in denen die Anthocyanidine stark angereichert waren, wurden direkt auf Chromatogrammbögen aufgetragen. Die Chromatogramme entwickelten wir in BEW und im "Forestal-Gemisch" (F) **). In beiden Gemischen trennten sich die Anthocyanidine des Rotweins deutlich in drei Zonen, die der Petuniablüten deutlich in zwei Zonen. Das "Forestal-Gemisch" erwies sich für die Trennung der Anthocyanaglykone besonders geeignet. Die R_f-Werte (Tab. 5) und die gleichfarbigen Substanzflecke zeigten die Identität der Petunia-Anthocyanidine mit Malvidin und Petunidin.

*) BEW = Butanol-Eisessig-Wasser; 4+1+5;

ÄAW = Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser; 10+2+3

²³⁾ P.DUPUY u. J.PUISAIS, C.R. hebdomadaire des Seances Acad. Sci., 240, 1802 (1955)

**) F = Eisessig-konz. HCl-Wasser; 30+3+10.

QUERCETIN

Tabelle 3

KÄMPFEROL

Glykosid	Max _I mp	Max _{II} mp	Vers _I mp	Vers _{II} mp	Glykosid	Max _I mp	Max _{II} mp	Vers _I mp	Vers _{II} mp
<u>Quercetin-3-galaktosid</u>	360	258	+73	+17	<u>Kämpferol-3-glukosid</u>	348	267	+47	+ 8
+ AlCl ₃	433	275	+30	+11	+ AlCl ₃	395(350)	275	+32	+ 8
+ NaAc	380	269	+75	+18	+ NaAc	380	275	+47	+11
+ NaAc + AlCl ₃	435	276	+18	+ 4	+ NaAc + AlCl ₃	395(350)	278	+ 7	+ 1
+ NaAc + H ₃ BO ₃	378	262			+ NaAc + H ₃ BO ₃	355	268		
<u>Quercetin-4'-glukosid</u>	365	254			<u>Kämpferol-3,7-diham- nosid (bisher Irrtümlich Kämpferol-3-rhamno- 4'-arabinosid)</u>	342	265	+53	+10
+ AlCl ₃	423 (356)	266	+58	+12	+ AlCl ₃	395(348)	275	+ 8	0
+ NaAc	390 (336)	275	+25	+21	+ NaAc	350	265	+43	+10
+ NaAc + AlCl ₃	420 (336)	268	+55	+14	+ NaAc + AlCl ₃	385(335)	275	+ 5	0
+ NaAc + H ₃ BO ₃	368	254	+ 3	0	+ NaAc + H ₃ BO ₃	347	265		
<u>Quercetin-3-rhamno- glukosid</u>	380	260	+70	+15	<u>Kämpferol-3-robinosido- 7-triamnosid</u>	350	266	+48	+ 9
+ AlCl ₃	430	275	+40	+13	+ AlCl ₃	398(355)	275	+ 6	0
+ NaAc	400	273	+75	+16	+ NaAc	356	266	+30	+ 9
+ NaAc + AlCl ₃	435	276	+20	+ 3	+ NaAc + AlCl ₃	400(345)	275	+ 4	0
+ NaAc + H ₃ BO ₃	380	263			+ NaAc + H ₃ BO ₃	354	266		
<u>Lösung F₂</u>	358	256	+72	+19	<u>Lösung F₁</u>	348	266	+48	+ 9
+ AlCl ₃	430	275	+32	+14	+ AlCl ₃	396(350)	275	+28	+ 9
+ NaAc	390	270	+77	+19	+ NaAc	376	275	+47	+12
+ NaAc + AlCl ₃	435	275	+18	+ 2	+ NaAc + AlCl ₃	395(340)	278	+ 7	+ 0
+ NaAc + H ₃ BO ₃	376	258			+ NaAc + H ₃ BO ₃	355	266		

Tabelle 5

		BEW		F	
		eigene Werte	Literaturwerte	eigene Werte	Literaturwerte
<u>Wein:</u>					
	Malvidin	0.45	0.48-0.53	0.58	0.55-0.65
	Petunidin	0.35	-	0.46	0.46
	Delphinidin	0.21	0.32-0.35	0.30	0.30-0.33
<u>Petunia:</u>					
	Malvidin	0.46	0.48-0.53	0.57	0.55-0.65
	Petunidin	0.35	-	0.47	0.46

Nach G.M.ROBINSON und R.ROBINSON ²⁴⁾ verändern sich die Anthocyane nach dem Besprühen mit 2proz. wäßriger Eisenchloridlösung folgendermaßen:

Cyanidin	tiefblau
Delphinidin	tiefblau
Petunidin	tiefblau
Pelargonidin	unverändert
Paeonidin	unverändert
Malvidin	unverändert

Die als Petunidin angesprochenen Flecke färbten sich tiefblau während die des Malvidins unverändert blieben.

G.M.ROBINSON und R.ROBINSON ²⁵⁾ entwickelten eine Methode, nach der man aus der Verteilung von gereinigten Anthocyanen zwischen Salzsäure und Isoamylalkohol Rückschlüsse auf den Glykosidcharakter der Anthocyane ziehen kann. Die Anthocyane gingen weder nach Zugabe von Wasser noch nach Zusatz einer gesättigten Kochsalzlösung in die Isoamylalkoholphase über. Damit war der Nachweis für Diglykoside gegeben.

Auf Grund dieser Beobachtung muß geschlossen werden, daß alle sechs Anthocyane der *Petunia nana* Diglykoside des Malvidins bzw. des Petunidins sind.

²⁴⁾ G.M.ROBINSON u. R.ROBINSON, Biochem.J. 25, 1687 (1931)

²⁵⁾ G.M.ROBINSON u. R.ROBINSON, Biochem.J. 26, 1647 (1932)

3) Leucoanthocyane

Als gemeinsame Vorstufe für Anthocyane und Flavone finden wir in der Literatur oft die Leucoanthocyane genannt ^{26, 27}). Diese farblosen Verbindungen lassen sich durch Kochen mit Mineralsäuren leicht in die entsprechenden Anthocyane überführen. W.SEYFFERT ²⁷) konnte diese Verbindungen sowohl in flavonfreien als auch in flavon- und anthocyanhaltigen Cyclamenblüten nachweisen. Er schließt daraus, daß wahrscheinlich die Flavone und die Anthocyane aus diesen gemeinsamen Vorläufern, den Leucoanthocyanen, entstehen. Wir untersuchten daher Cyclamenblüten und die Blüten unserer vier Petunientypen nach dem von E.C.BATE-SMITH und N.H.LERNER ²⁸) ausgearbeiteten Verfahren, dem "Anthocyanidin-" und dem "Vanillin-Test".

Beide Teste fielen für die Cyclamenblüten positiv aus, während sie bei den Blüten aller Petunientypen negativ waren.

Damit dürfte die Abwesenheit von Leucoanthocyanen in Petunienblüten erwiesen sein.

4) Säuren

α) Phenolische Carbonsäuren

Die Äthylacetatausschüttelung des Extraktes, der für die Isolierung der Flavone verwendet worden war, zeigte auf dem Papierchromatogramm vier im UV-Licht blau fluoreszierende Flecke (S_1 - S_4). Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß in frischen methanolischen Extrakten der Blüten des Typs "HIMMELSKÖNIGIN" nur die zwei blau fluoreszierenden Flecke S_3 und S_4 vorhanden waren. Erst nach längerem Stehen oder nach der Hydrolyse konnten die Flecke S_1 und S_2 nachgewiesen werden. Der Petunientyp "WEISSE WOLKE", der weder Flavone noch Anthocyane enthielt, zeigte auch in frischen Extrakten S_1 und S_2 in größerer Konzentration und außerdem zwei weitere blau fluoreszierende Flecke S_5 und S_6 . Die Verteilung dieser Substanzen auf dem Chromatogramm veranschaulicht Abbildung 8 (S. 17).

Wir isolierten die einzelnen Substanzen aus einem frischen Extrakt der W.W. nach der präparativen Papierbogenmethode. Kristalline Produkte konnten dabei nicht erhalten werden.

²⁶) W.E.HILLIS, Nature (London) 175, 597 (1955)

²⁷) W.SEYFFERT, Z.indukt.Abstammungs- u. Vererbungslehre 87, 311 (1955)

²⁸) E.C.BATE-SMITH u. N.H.LERNER, Biochem.J. 58, 126 (1954)

Die tiefblaue Fluoreszenz der Flecke im UV-Licht wies auf Pflanzensäuren oder Cumarine hin. Schon nach den papierchromatographischen Untersuchungen war die Identität von S_1 und S_2 mit der zum Vergleich mitlaufenden Ferulasäure bzw. Kaffeesäure ziemlich gesichert. Die auf dem Chromatogramm ausgeführten Farbreaktionen und die UV-Absorptionsspektren zeigten ebenfalls die Identität der Substanz S_1 mit Ferulasäure und S_2 mit Kaffeesäure (Tab. 6, s. unten).

Abbildung 8

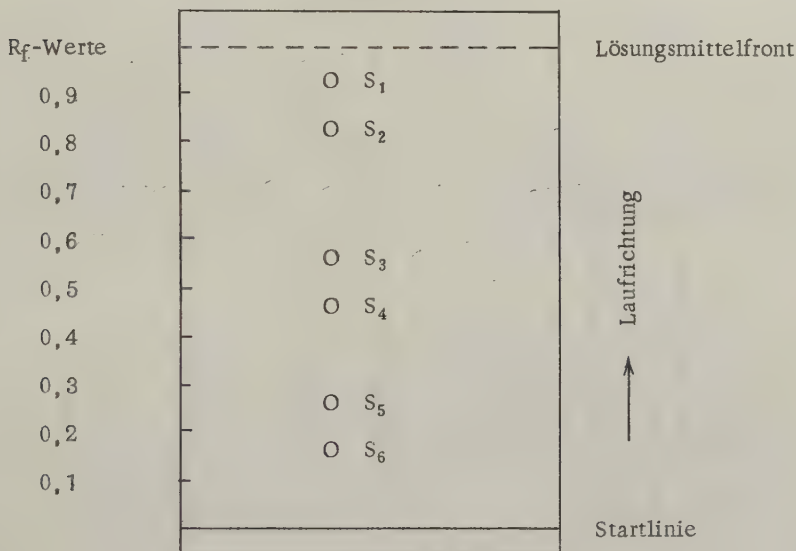


Tabelle 6

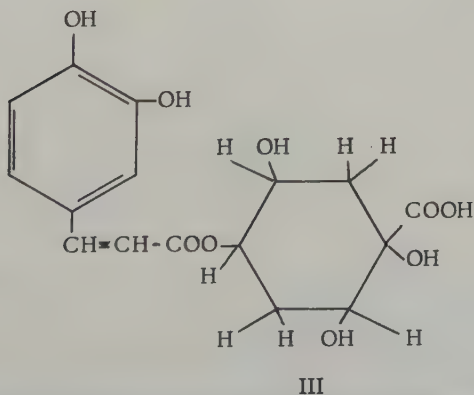
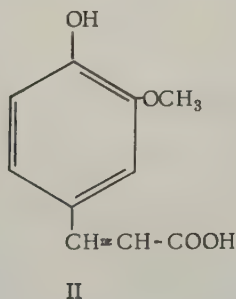
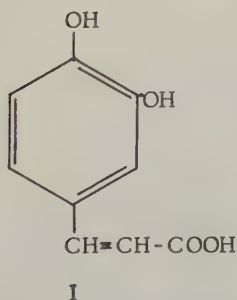
Substanz	R _f -Werte		Fluoreszenz im UV-Licht				FeCl ₃	Max. der UV-Spektren	
	BEW	ÄAW	unbe-handelt	NH ₄ Dampf	Alumin.-sulfat	Blei-azetat		I. mp	II. mp
S_1	0.88	0.94	blau	blau	blau	blau	rötlich	320	233
Ferula-säure	0.87	0.94	blau	blau	blau	blau	rötlich	320	233
S_2	0.80	0.84	blau	blau	blau	gelb	grünlich	325	241
Kaffee-säure	0.80	0.84	blau	blau	blau	gelb	grünlich	325	241

Tabelle 7

Sub- stanz	R _f - Wert	Hydrolyse	NH ₄ - Dampf	Blei- azetat	Molisch	Maxima mp I II	+ NaAc mp I II	Versch. mp I II	AlCl ₃ mp I II	Versch. mp I II
S ₁	0.94	Ferulasäure	blau	blau	-	320 233	304 230	-16 - 3	332 240	+12 + 7
S ₂	0.84	Kaffeesäure	blau	gelb	-	325 241	317 230	- 8 -11	370 229	+45 -12
S ₃	0.55	Ferulasäure Chinasäure	gelb	blau	-	328	328 230	0	328 250	0
S ₄	0.44	Kaffeesäure Chinasäure	gelb	gelb	-	328 250	360 230	+32 -20	333 250	+ 5 0
S ₅	0.23	Kaffeesäure Ferulasäure Chinasäure	gelb	blau	-	320 250	320 230	0 -20	320 256	0 + 6
S ₆	0.15	Kaffeesäure Ferulasäure Chinasäure	gelb	gelb	+	335 250	335 230	0 -20	365 256	+30 + 6

Die übrigen Substanzen wurden einer Hydrolyse mit 2proz. Salzsäure unterworfen, ihre Absorptionsspektren und ihre Verschiebungen mit Natriumazetat und Aluminiumchlorid gemessen. Die Werte sind mit den Ergebnissen der Hydrolyse, der Molisch-Reaktion und einiger Farbreaktionen in Tabelle 7 zusammengefaßt (S. 18).

Mit Natriumazetat tritt bei den phenolischen Carbonsäuren, bedingt durch die freie Carboxylgruppe, eine hypsochrome Verschiebung der UV-Spektren ein, während bei den Estern dieser Säuren eine bathochrome Verschiebung des Hauptmaximums zu beobachten ist. Die Möglichkeiten zur Metallkomplexbildung sind bei den phenolischen Carbonsäuren viel geringer als bei den Flavonen. Lediglich die Kaffeesäure (I) weist benachbarte OH-Gruppen auf. Bei der Ferulasäure (II) ist eine Hydroxylgruppe veräthert, eine Komplexbildung daher nicht möglich. Die Chlorogensäure (III), ein Ester aus Chinasäure und Kaffeesäure, besitzt hingegen zwei freie OH-Gruppen, so daß die Möglichkeit einer Komplexbildung und damit eine Verschiebung der UV-Spektren gegeben sein muß.



Die UV-Absorptionsspektren einiger Testsubstanzen und ihre Verschiebungen wurden gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 (S. 20) wiedergegeben.

Tabelle 8

	Maxima in m μ			Verschiebungen		
	II	Ia	I	II	Ia	I
<u>Kaffeesäure</u>	241	299	325			
+ NaAc	230	287	317	-11	-12	- 8
+ NaAc + AlCl ₃	230	304	344	-11	+ 5	+19
+ AlCl ₃	229	265	370	-12	-34	+45
+ H ₃ BO ₃ + NaAc	230	294	328	-11	- 5	+ 3
<u>Ferulasäure</u>	233.5	296 *)	320			
+ NaAc	230	277	304	- 3.5	-19	-16
+ NaAc + AlCl ₃						
+ AlCl ₃	240.5		332	+ 7		+12
+ H ₃ BO ₃ + NaAc	230	277	304	- 3.5	-19	-16
<u>3,4-Dimethyloxyzimtsäure</u>	235	293	318			
+ NaAc		274				
+ NaAc + AlCl ₃						
+ AlCl ₃	244		330			
<u>Chlorogensäure</u>	244		329			
+ NaAc	230		339	-14		+10
+ NaAc + AlCl ₃	230	268	375	-14		+46
+ AlCl ₃		259	357			+28
+ H ₃ BO ₃ + NaAc	230	298	350	-14		+21
<u>Isochlorogensäure</u>	244		330			
+ NaAc	231		334	-13		+ 4
+ NaAc + AlCl ₃	230	266	374	-14		+44
+ AlCl ₃		261	357			+27
+ H ₃ BO ₃ + NaAc	230	257	350	-14		+20
<u>Cynarin **)</u>	250	295 *)	328			
+ NaAc	230	270	360	-20	-25	+32
+ NaAc + AlCl ₃	230	264	370	-20	-31	+42
+ AlCl ₃	252	300	332	+ 2	+ 5	+ 4
+ H ₃ BO ₃ + NaAc	256		348	+ 6		+20

*) Inflection (Knie)

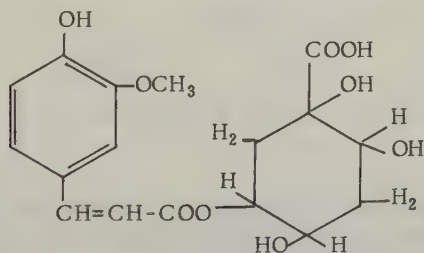
**) Cynarin: aus Artischocken nach der präparativen Papierbogenmethode isoliert.

Auf Grund der Absorptionsspektren und deren Verschiebungen nach Zusatz von Natriumazetat und Aluminiumchlorid, auf Grund der Hydrolyseergebnisse und der Sprühreaktionen können wir über die Substanzen S_1 bis S_6 folgendes aussagen:

S_1 : hat in zwei Lösungsmittelsystemen die gleichen R_f -Werte, zeigt die gleichen Farbreaktionen und die gleichen Absorptionsmaxima und Verschiebungen wie Ferulasäure. S_1 ist daher identisch mit Ferulasäure.

S_2 : zeigt bei allen durchgeführten Reaktionen Identität mit Kaffeesäure.

S_3 : hat etwa den gleichen R_f -Wert wie Chlorogensäure. Die Hydrolyse ergab jedoch Ferulasäure und Chinasäure. Die Messungen der Absorptionsspektren nach Zusatz von Natriumazetat und nach Aluminiumchlorid ergaben nicht die der Chlorogensäure entsprechenden Verschiebungen. Beim Besprühen mit basischem Bleiazetat färbt sich Chlorogensäure gelb, S_3 bleibt dagegen blau. S_3 dürfte daher ein Ester aus Chinasäure und Ferulasäure sein und folgende Formel besitzen:



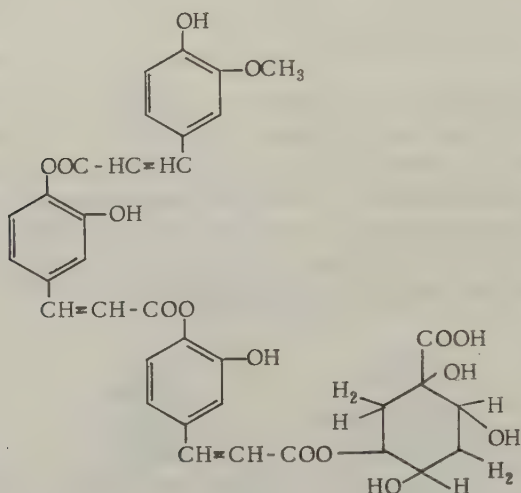
S_4 : Nach L.PANIZZI und M.L.SCARPATI ^{29, 30)} enthält die Artischocke (*Cynara Scolymus* L.) ein Depsid aus 2 Mol. Kaffeesäure und 1 Mol Chinasäure, genannt Cynarin. Diese Substanz isolierten wir aus einem wäßrigen Auszug von frischen Artischockenblättern über das Streifenchromatogramm. Sie zeigte dieselben R_f -Werte in zwei Lösungsmittelsystemen, dasselbe Absorptionsspektrum und annähernd dieselben Verschiebungen wie S_4 . Bei der Hydrolyse ergaben beide Substanzen Kaffeesäure und Chinasäure, mit Bleisalz und mit Ammoniak färbten sich beide gelb. S_4 dürfte daher identisch mit Cynarin sein.

S_5 : eine sehr hydrophile Substanz, ergab bei der Hydrolyse neben Chinasäure, Kaffeesäure und Ferulasäure. Die Absorptionsmaxima wurden weder durch Natriumazetat noch durch Aluminiumchlorid verschoben, und beim Be-

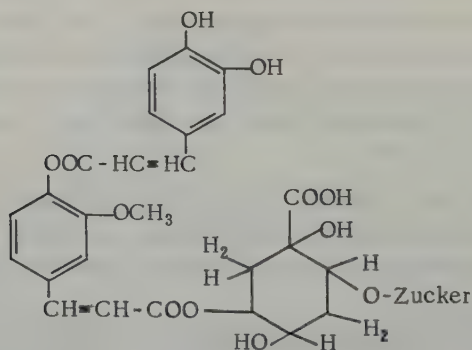
²⁹⁾ L.PANIZZI u. M.L.SCARPATI, Gazz.chim.ital. 84, 792, 806 (1954)

³⁰⁾ L.PANIZZI u. M.L.SCARPATI, Nature (London) 174, 1062 (1954)

sprühen mit basischem Bleiazetat trat keine Gelbfärbung auf. Aus diesen beiden Tatsachen glauben wir schließen zu können, daß keine benachbarten freien Hydroxylgruppen im Molekül vorliegen. Die Ferulasäure muß endständig gruppiert sein, und der Verbindung kann etwa folgende Formel zukommen:



S₆ ergab bei der Hydrolyse Kaffeesäure, Ferulasäure und Chinasäure. Mit Aluminiumchlorid trat eine starke bathochrome Verschiebung und beim Besprühen mit Bleisalz eine Gelbfärbung ein. Daher müssen zur Komplexbildung freie benachbarte OH-Gruppen vorhanden sein. Bei dieser Substanz fiel die Molisch-Reaktion auf Zucker positiv aus. Es handelt sich also bei der Substanz S₆ um ein Glykosid, für das folgende Strukturformel möglich wäre:

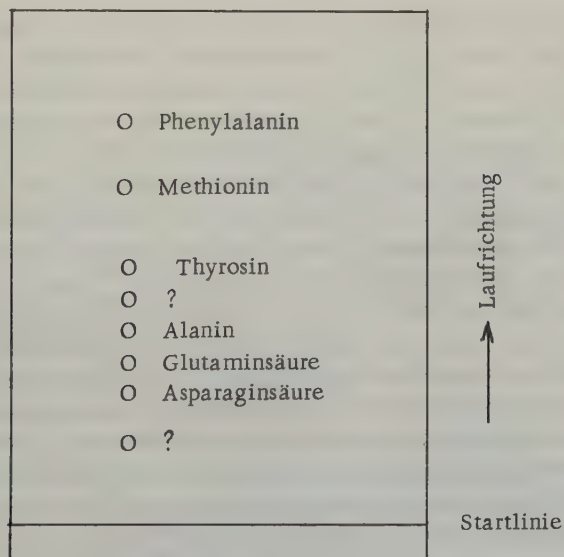


Durch unsere Untersuchungen ist natürlich nicht zu entscheiden, in welchem Verhältnis die einzelnen Substanzen im Molekül vorliegen, da eine Molekulargewichtsbestimmung in keinem Fall durchgeführt wurde. Nach den niedrigen R_f -Werten zu urteilen, ist es aber durchaus möglich, daß 2 Mol Kaffeesäure oder Ferulasäure am Aufbau der Säure S_6 beteiligt sind.

β) Aminosäuren

Zum Nachweis der Aminosäuren ließen wir Chromatogramme von Rh, W.W. und him/viol. mit Vergleichssubstanzen 50 Stunden in BEW laufen und entwickelten mit Ninhydrinlösung nach dem üblichen Verfahren. Alle Blütenextrakte zeigten in qualitativer Übereinstimmung acht Aminosäuren. Papierchromatographisch konnten so nachgewiesen werden: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Tyrosin, Methionin und Phenylalanin. Die Färbung war bei Tyrosin und Phenylalanin sehr gering. Eine Skizze veranschaulicht die Lage der Aminosäuren auf dem Papierchromatogramm nach einer Laufzeit von 50 Stunden in BEW.

Abbildung 9



b) Quantitative Untersuchungen

Die herkömmlichen quantitativen Bestimmungsmethoden für Flavone und Pflanzensäuren setzen alle voraus, daß eine größere Menge Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht. Außerdem sind sie meist sehr umständlich und zeitraubend. In letzter Zeit beschrieben mehrere Autoren Methoden, um Substanzen auf dem Chromatogramm quantitativ zu messen. Bei einigen dieser Verfahren wird die Lichtabsorption der Substanz direkt vom Papier gemessen. J.R.TROYER³¹⁾ gelang es mit einer solchen Methode, in einem Extrakt von Buchweizensämlingen fünf Flavonoide, die bis auf Rutin unbekannt waren, nebeneinander quantitativ zu erfassen. Für die unbekannten Substanzen konnte er natürlich keine absoluten, sondern nur relative Werte erhalten.

Für unsere Arbeit war es nicht wichtig, genaue Absolutwerte der Petunieninhaltsstoffe zu bekommen, vielmehr sollte festgestellt werden, in welchen Massen die Inhaltsstoffe der Petunienblüte im Laufe einer Entwicklungsperiode zu- oder abnehmen.

Wir entwickelten daher ein ähnliches Verfahren wie I.R.TROYER und benutzten für unsere Messungen das Chromatogramm-Zusatzgerät zum Zeiss-Spektralphotometer.

Durch einfaches Ausschütteln war es nicht möglich, die einzelnen Stoffgruppen wie Flavone, Anthocyane und Pflanzensäuren voneinander zu trennen. Daher wurden quantitative Mengen frischer, methanolischer Blütenextrakte direkt chromatographiert und die Chromatogramstreifen bei einer konstanten Wellenlänge von 328 m μ durchgemessen. Die erhaltenen Kurven wurden planimetrisch ausgewertet. Die Wellenlänge von 328 m μ wurde gewählt, weil sie ein gewisses Mittel aus den Maxima der einzelnen Substanzen darstellt. Die Hauptmaxima der Säuren (S₁-S₆) liegen zwischen 320 und 335 m μ , die der Flavone (F₁ und F₂) bei 348 und 358 m μ . Nach Literaturangaben (S.A.SCHOU³²⁾ und H.REZNIK³³⁾) liegen die Hauptmaxima der Anthocyane zwischen 500 und 540 m μ , Absorptionsmessungen auf dem Papier sind aber in diesem Bereich nicht mehr möglich. Ein zweites Maximum der Malvidin-, Petunidin- und Cyanidinglykoside liegt zwischen 270 und 280 m μ , zwischen 410 und 430 m μ ist ein Minimum. Messungen bei anderen Wellenlängen zeigten für manche Substanzen eine stärkere Absorption, bei anderen wiederum eine zu schwache, so daß eine gemeinsame Auswertung aller Substanzen nicht möglich war.

³¹⁾ J.R.TROYER, Plant Physiol. 31, 71 (1956)

³²⁾ S.A.SCHOU, Helv.chim.Acta 10, 907 (1927)

³³⁾ H.REZNIK, S.-B.Heidelberger Akad.Wiss. 125 (1956)

Bei einer Wellenlänge von 328 m μ wurden also zunächst die Petunienblüten der Typen him/viol., him/rot, W.W. und R.h. durchgemessen, um die mengenmäßige Verteilung der einzelnen Substanzen in den verschiedenen Blüten miteinander vergleichen zu können. Die Abbildungen 10 bis 13 zeigen die ausgewerteten Kurven mit den gemessenen Chromatogramstreifen.

In einer Tabelle sind die Mittelwerte der planimetrischen Auswertungen aus fünf Messungen in cm² angegeben.

Tabelle 9

	him/viol.	him/rot	W.W.	R.h.
S ₁	-	-	21.2	15.4
S ₂	-	-	20.4	14.8
S ₃	14.5	10.8	14.4	11.5
S ₄	13.7	14.0	25.0	19.5
F ₁	25.0	13.1	-	19.9
F ₂	40.7	15.1	-	37.3
S ₅	-	-	16.8	-
A ₁	-	14.5	-	25.0
S ₆	10.5	14.9	26.1	19.6
A ₂	-	18.1	-	39.1

Die Kurvenbilder 10 bis 13 und die Tabelle 9 bestätigen die bereits oben festgestellten Tatsachen, daß

1. die Säuren S₁ - S₆ am stärksten in der W.W. vertreten sind,
2. die Säuren S₁, S₂ und S₅ den Typen him/viol. und him/rot vollkommen fehlen,
3. die Flavonoide in him/viol. und R.h. am stärksten konzentriert sind,
4. in der W.W. keine Flavonoide enthalten sind (die an dieser Stelle auftretende Kurve stammt von einer auf dem Chromatogramm nicht sichtbaren Säure, die später in stärkerer Konzentration auftritt
5. der Flavonoidgehalt von him/rot weniger als 50% im Verhältnis zu him/viol. oder R.h. beträgt.

Nach diesen vergleichenden Untersuchungen, sollte jetzt mit Hilfe der gleichen Methode die Flavonol- und Anthocyanbildung der Petunienknospen in verschiedenen Entwicklungsstadien erfaßt werden. I.STÖRMER und H.v.WITSCH ³⁴⁾ hatten nämlich mit Hilfe von histo-chemischen Reaktionen im Laufe der Blütenentwicklung bei Petunien ursprünglich eine starke Flavonkonzentration beobachtet, die mit der später beginnenden Anthocyanbildung mehr und mehr abnahm und schließlich ganz verschwand.

Für unsere Versuche wählten wir die tiefviolette R.h. aus, weil sie sowohl einen starken Anthocyan- wie auch Flavongehalt aufweist. Wir untersuchten ihre Knospen vom eben faßbaren Stadium an bis zur voll entfalteten Blüte.

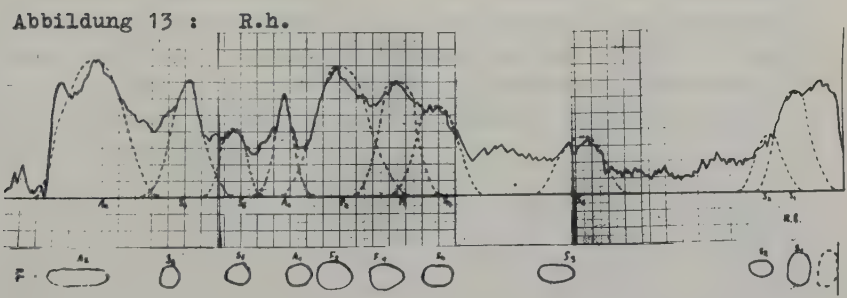
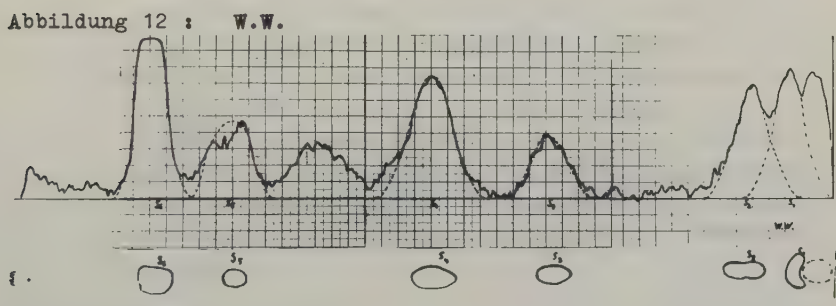
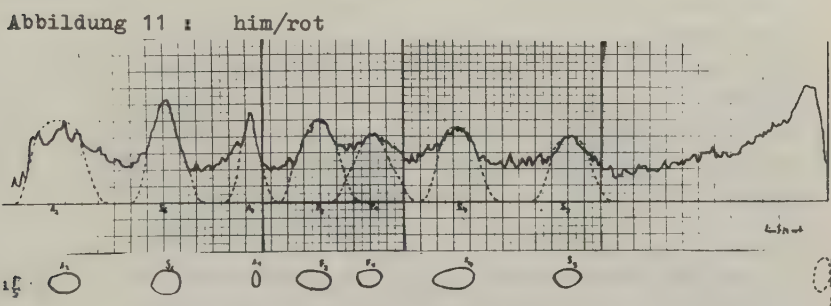
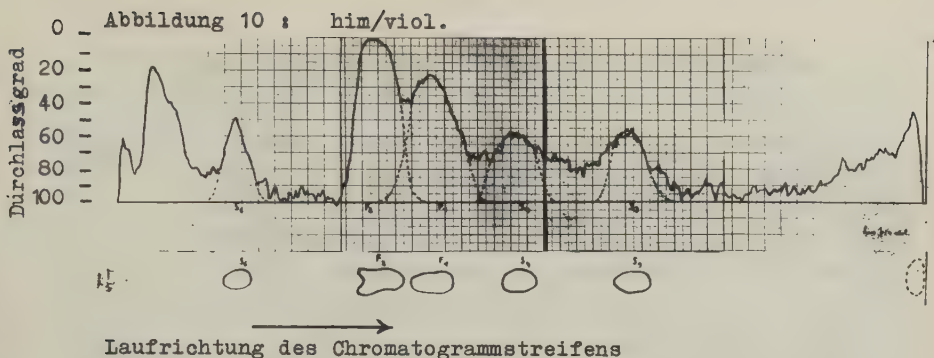
Tabelle 10 gibt die planimetrische Auswertung der erhaltenen Kurven in cm² an. Die Kurvenbilder der acht verschiedenen Entwicklungsstadien der R.h.-Knospen sind im experimentellen Teil mit denen der W.W.-Knospen wiedergegeben.

Tabelle 10

	1-2	3-5	5-10	10-15	15-20	20-25	30-40 *)	R.h.
S ₁	-	(+)	+	+	+	+	+	16.8
S ₂	-	(+)	+	+	+	+	+	15.2
S ₃	11.2	13.6	10.5	11.6	12.0	13.4	7.8	11.6
S ₄	14.4	18.8	14.1	17.3	19.5	19.1	19.0	19.2
F ₁	-	-	-	-	8.3	14.3	18.3	19.5
F ₂	19.1	20.2	21.0	29.3	33.5	37.0	38.8	40.2
A ₁	-	-	4.0	4.5	6.0	12.4	22.3	25.6
S ₆	8.9	10.0	7.1	5.6	-	10.0	18.3	21.0
A ₂	-	-	-	-	-	24.1	37.0	40.6
F ₃	-	11.7	7.5	5.0	24.0	-	-	-

³⁴⁾ I.STÖRMER u. H.v.WITSCH, Planta 27, 1-28 (1937)

*) Knospenlänge in mm



Durch die quantitativen Messungen der R_h-Knospen können wir über die Bildung der einzelnen Substanzen folgendes aussagen:

1. Flavone: Bei einer Knospengröße von 15-20 mm ist zum ersten Mal das Flavon F₁ zu erkennen. Bis zur Vollblüte nimmt sein Gehalt ständig zu. Das Flavon F₂ ist schon im kleinsten Stadium der Blütenentwicklung deutlich zu erfassen. Sein Gehalt in der Knospe bleibt zunächst konstant, steigt aber dann bei einer Knospenlänge von 10-15 mm sprunghaft an.
2. Anthocyane: Die Anthocyanbildung (A₁) beginnt bei einer Knospenlänge von 5-10 mm sehr schwach, wird erst bei 20-25 mm stärker und steigt bis zur Vollblüte ständig an. A₂ tritt erstmals bei Knospen einer Größe von 20-25 mm auf. Bei kleineren Knospen trat an der Stelle, an der später das Anthocyan A₂ auftaucht, eine gelbe Substanz auf, die als F₃ bezeichnet wurde. Ob diese Substanz bei beginnender Anthocyanbildung verschwindet, oder ob sie vom Anthocyan überlagert wird, konnte nicht festgestellt werden.
3. Säuren: Die Kurven der Säuren S₁ und S₂ konnten nicht ausgewertet werden, weil sie zu stark vom Chlorophyll im Vorlauf überlagert wurden. Je kleiner die Knospen sind, umso stärker ist ihr Chlorophyllgehalt. Mit dem Auge konnte man jedoch eine ständige Zunahme dieser Säuren erkennen. Die Konzentration der Säuren S₃ und S₄ unterliegen während der ganzen Entwicklungsperiode nur geringen Schwankungen. Die Säure S₆ ist schon in den kleinsten Knospen nachzuweisen. Ihr Gehalt nimmt aber zunächst ab und ist bei einer Knospenlänge von 15-20 mm kaum noch zu erfassen, dann steigt ihr Gehalt bis zur Vollblüte wieder stark an.

Um auch einen besseren Überblick über die Entwicklung der phenolischen Säuren zu bekommen, untersuchten wir die verschiedenen Entwicklungsstufen der flavon- und anthocyanfreien W.W.-Blüten in gleicher Weise. Es war festzustellen, ob ein Unterschied bei der Entwicklung der Säuren in flavonfreien und flavonhaltigen Blüten besteht, und ob die phenolischen Säuren als Vorstufe für die Flavone in Frage kommen.

Tabelle 11

	1-2	3-5	5-10	10-15	15-20	20-25	30-40 *)	W.W.
S ₁	-	9.3	12.4	14.8	14.2	13.6	17.0	22.8
S ₂	-	6.5	7.5	9.4	13.8	13.2	16.1	17.8
S ₃	-	-	-	-	4.4	-	-	16.8
S ₄	8.9	8.2	8.0	8.0	8.8	8.2	8.1	26.1
S _A	13.2	14.0	9.5	12.0	12.7	23.8	-	-
S _B	19.0	19.8	12.9	17.5	17.6	21.1	9.8	5.7
S ₅	13.9	12.8	12.2	12.9	16.3	12.7	14.5	17.1
S ₆	24.3	19.0	23.3	23.5	23.6	24.1	26.1	26.1

Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen mit den Knospen der W.W. Vergleicht man die Entwicklung der einzelnen Säuren in den W.W.-Knospen mit der in den R.h.-Knospen, so läßt sich folgendes erkennen:

1. S₁ und S₂: Für die Säuren S₁ und S₂ läßt sich sowohl in den W.W.- wie auch bei den R.h.-Blüten ein ständiger Anstieg der Konzentration beobachten.
2. S₃ und S₄: Während der Gehalt an S₃ und S₄ in allen Blüten der R.h. ziemlich konstant war, konnten wir erst bei der voll entfalteten W.W.-Blüte S₃ in größerer Konzentration feststellen. Der Gehalt an S₄ ist in den Knospen der W.W. geringer als in denen von R.h., in der aufgeblühten W.W. steigt er jedoch stark an.
3. S₅ und S₆: Die Konzentration von S₅ und S₆ ist in allen Entwicklungsstadien der W.W. ziemlich konstant, dagegen unterliegt die Konzentration von S₆ in den R.h.-Knospen großen Schwankungen.
4. S_A und S_B: In den kleineren Knospen der W.W. beobachteten wir zwei im UV-Licht blau fluoreszierende Flecke (S_A und S_B), die bei voll entfalteten Blüten niemals aufgetreten waren. Die Konzentration dieser Substanzen ist bei einer Knospenlänge von 20-25 mm am größten und fällt in dem Augenblick, da S₃ und S₄ entstehen, stark ab.

*) Knospenlänge in mm

Stellungnahme zum quantitativen Meßverfahren

Die oben aufgeführten Ergebnisse lassen erkennen, daß es durchaus möglich ist, mit Hilfe unserer Methode die Zu- und Abnahme einer Substanz im Laufe einer Entwicklungsperiode zu erfassen. Diese Methode hat gegenüber anderen den Vorteil, daß mit sehr geringen Mengen gearbeitet werden kann und daß mehrere Substanzen nebeneinander direkt auf dem Chromatogramm gemessen werden können. Nachteile dieser Methode sind, daß man keine absoluten Werte erhält und daß die Fehlerquellen nicht unerheblich sind. Einmal ist die Absorption und die Streuung des Chromatogrammpapiers von beträchtlicher Größe, da das Papier keine einheitliche Struktur besitzt; zum anderen hat der Lichtstrahl des Spektralphotometers einen begrenzten Umfang, und daher kann er an manchen Stellen nur durch einen Teil des Substanzfleckes gehen, während er an anderen Stellen, z.B. bei Schwanzbildungen, nicht mit seiner ganzen Stärke den Flecken erfaßt. Daher eignet sich diese Methode nur für vergleichende Messungen unter gleichen Bedingungen, allerdings auch für mehr oder weniger unbekannte Substanzen.

Ein weiterer Fehler kommt bei unseren Untersuchungen dadurch noch hinzu, daß infolge des Materialmangels nur jeweils eine Messung durchgeführt werden konnte und daher eine Fehlerberechnung nach der "Methode der kleinsten Quadrate" nicht durchzuführen war.

Quantitative Bestimmung der Aminosäuren

Die quantitative Beurteilung der Konzentration von Aminosäuren in den einzelnen Entwicklungsstadien wurde nur durch Abschätzen der Substanzfleckes auf dem Chromatogramm ausgeführt. Es zeigte sich aber deutlich, daß der Gehalt an Phenylalanin und Tyrosin in den kleinsten Knospen der R.h. am stärksten war und im Laufe der Entwicklung stark abnahm. Die Knospen der W.W. enthielten dagegen kein Phenylalanin und sehr wenig Tyrosin. Erst bei der voll entfalteten Blüte der W.W. nahmen die Konzentrationen dieser Stoffe zu.

c) Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse

Zusammenfassend läßt sich über die Inhaltsstoffe der untersuchten *Petunia-nana*-Typen folgendes aussagen:

1. Flavone

- a) In drei von vier untersuchten Typen konnten Quercetin-3-galaktoglukosid und Kämpferol-3-galaktoglukosid nachgewiesen werden.
- b) Die Konzentration dieser Verbindungen in den Blütenknospen nimmt im Laufe der Entwicklungsperiode ständig zu.

2. Anthocyane

- a) In den gefärbten Blütentypen wurden sechs Anthocyane festgestellt. Die Anthocyanidine dieser Verbindungen sind Malvidin und Petunidin.
- b) Eine stärkere Anthocyanbildung beginnt bei einer Knospenlänge von 20-25 mm und steigt bis zur voll entfalteten Blüte ständig an.

3. Phenolische Säuren

- a) Alle untersuchten Blütentypen enthalten Kaffeesäure und Ferulasäure oder Derivate dieser Säuren.
- b) Der Gehalt an Kaffeesäure und Ferulasäure steigt in den wachsenden Blütenknospen ständig an. Die Bildung der Kaffeesäure-Ferulasäure-Derivate scheint in Flavon- und Anthocyan-freien Blüten anders zu verlaufen als in den Blüten, die Flavone und Anthocyane enthalten.

4. Aminosäuren

- a) Papierchromatographisch wurden Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Tyrosin, Methionin, Phenylalanin und zwei unbekannte Aminosäuren nachgewiesen.
- b) Der Gehalt von Phenylalanin und Tyrosin ist in den kleinsten Knospen der tiefvioletten R.h. am stärksten, er nimmt im Laufe der Entwicklungsperiode ab. Die Knospen der weißblühenden W.W. enthielten kein Phenylalanin und wenig Tyrosin.

5. Leucoanthocyane

Leucoanthocyane konnten in keinem der untersuchten *Petunia-nana*-Typen nachgewiesen werden.

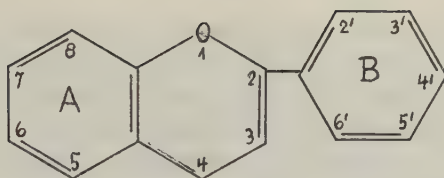
d) Diskussion der Ergebnisse

Nach den neuesten Forschungsergebnissen ist die Annahme berechtigt, daß die beiden Benzolringe des Flavonoidsystems auf ganz verschiedenem Wege entstehen. A.J.BIRCH ³⁵⁾, H.GRIESEBACH ³⁶⁾ und E.W.UNDERHILL, J.E.WATKIN und A.C.NEISH ³⁷⁾ konnten nachweisen, daß der A-Ring durch Kondensation von Essigsäure nach dem Schema einer Kopf-Schwanz-Addition gebildet wird und der B-Ring und die C-Atome 2, 3 und 4 von einer Phenylpropanverbindung geliefert werden.

³⁵⁾ A.J.BIRCH u. Mitarbeiter, Nature (London) 172, 902 (1953)

³⁶⁾ H.GRIESEBACH, Z.Naturforsch. 12b, 227 (1957)

³⁷⁾ E.W.UNDERHILL, J.E.WATKIN u. A.C.NEISH, Canad.J.biochem.Physiol. 35, 219 u. 229 (1957)



Nach den Arbeiten von E.B.KALAN ³⁸⁾, P.R.SRINIVASAN ³⁹⁾ und B.D.DAVIS ⁴⁰⁾ entstehen die Phenylpropan-Verbindungen auf dem Weg über Sedoheptulose, Dehydrochinasäure, Shikimisäure, Prephensäure, Phenylbrenztraubensäure und Phenylalanin. A.J.BIRCH konnte zeigen, daß Phenylalanin fermentativ in Tyrosin, Dioxyphenylalanin, Dioxyphenylpropionsäure und Kaffeesäure umgewandelt werden kann. Der Kaffeesäure kommt nach den Arbeiten von T.A.GEISSMAN und E.HINREINER ⁴¹⁾, H.RUCKENBROD ⁴²⁾ und A.J.BIRCH ³⁵⁾ eine Schlüsselstellung in der Flavonoidsynthese zu. T.A.GEISSMAN und J.B.HARBORNE ⁴³⁾ nehmen an, daß die Kaffeesäure als Vorstufe für die Bildung der Flavonoide mit 3',4'- und 3',4',5'-Hydroxylierung (z.B. Quercetin, Malvidin) in Frage kommt, während bei der Synthese der 4'-Hydroxy-Verbindungen (z.B. Kämpferol, Pelargonidin) die p-Cumarsäure auftritt. Nach den letzten Arbeiten von E.W.UNDERHILL, J.E.WATKIN und A.C.NEISH ⁴⁴⁾ mit markierten Verbindungen an Buchweizenstecklingen, kommen als Vorstufen für das Quercetin weniger Kaffeesäure als vielmehr Shikimisäure und Phenylalanin in Frage.

Trotz dieser Kenntnisse ist unser Wissen über die Entstehung der Flavonoidverbindungen noch sehr lückenhaft. Wir können heute noch nicht mit Bestimmtheit sagen, welche Phenylpropan-Verbindungen zum Aufbau des B-Ringes bei einzelnen Flavonoid-Verbindungen herangezogen werden. Ob die Verknüpfung des A-Ringes mit dem B-Ring über Zwischenstufen verläuft und welcher Art die entstehenden Verbindungen sind, ist bis heute noch nicht endgültig aufgeklärt worden.

W.SEYFFERT ⁴⁵⁾ und andere Autoren nehmen an, daß Leucoanthocyane die unmittelbaren Vorläufer der Anthocyane und Flavone sind.

³⁸⁾ E.B.KALAN, B.P.DAVIS, P.R.SRINIVASAN u. D.B.SPRINSON, J.biol. Chemistry 223, 907 (1956)

³⁹⁾ P.R.SRINIVASAN, M.KATAGIRI u. D.P.SPRINGSON, J.Amer.chem.Soc. 77, 4943 (1955)

⁴⁰⁾ B.D.DAVIS, Nature (London) 166, 1120 (1950)

⁴¹⁾ T.A.GEISSMAN u. E.HINREINER, Bot.Rev. 18, 77 (1952)

⁴²⁾ H.RUCKENBROD, Planta 46, 19 (1955)

⁴³⁾ T.A.GEISSMAN u. J.B.HARBORNE, Arch.Biochem.Biophysics 55, 447 (1955)

Was die Beziehung zwischen Anthocyanen und Flavonen betrifft, so beobachteten I.STÖRMER und H. v.WITSCH ⁴⁶⁾ bei *Petunia* während der Blütenentwicklung einen Abbau und letzten Endes ein gänzliches Verschwinden der Flavonole im Laufe der Anthocyan-Bildung. Sie schlossen daraus, daß Flavonole durch Reduktion in Anthocyane umgewandelt werden und daß die Flavonole die unmittelbaren Vorstufen der Anthocyane seien.

Demgegenüber konnten wir keine Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen von I.STÖRMER und H.v.WITSCH feststellen. Wir wiesen nach, daß die Konzentration der Flavonole im Laufe der Blütenentwicklung, auch während der Anthocyanbildung, ständig zunimmt. Außerdem müßten, wenn die Flavonole unmittelbar in Anthocyane umgewandelt würden, innerhalb derselben Blüte zumindest die Substituenten am Flavonaglykon denen am Anthocyanaglykon entsprechen. Wenn als Flavonol Quercetin auftritt, müßte man als Anthocyanidin das korrespondierende Cyanidin finden, also Kämpferol gemeinsam mit Pelargonidin oder Myrizetin gemeinsam mit Delphinidin. Wir konnten aber bei der Identifizierung der Aglykone nur Kämpferol und Quercetin und als Anthocyanidine nur die beiden Methyläther des Delphinidins (Monomethyläther: Petunidin und Dimethyläther: Malvidin) feststellen. Damit dürfte eine direkte Umwandlung der Flavonole in die Anthocyane auszuschließen sein.

Im Gegensatz zu W.SEYFFERT ⁴⁷⁾, der in *Cyclamen*blüten Leucoanthocyane feststellte, die den Anthocyanen der gleichen Blüte homolog waren, konnten wir in keinem der vier untersuchten Blütentypen der *Petunia* diese Verbindung nachweisen. Leucoanthocyane können also in unserem Falle mit großer Wahrscheinlichkeit nicht die Vorstufen der Anthocyane und Flavone sein. Der positive Ausfall der Leucoanthocyanreaktionen bei den *Cyclamen*blüten und der negative bei den *Petunien*blüten stimmt mit dem Ergebnis von E.C.BATE-SMITH und N.H. LERNER ⁴⁸⁾ überein. Sie stellten Leucoanthocyane vorwiegend im Gewebe holziger Gewächse fest. Zu den wenigen krautigen Pflanzenfamilien, die Leucoanthocyane enthalten, gehört unter anderen auch die Familie der Primulaceen (*Cyclamen*), nicht aber die der Solanaceen (*Petunien*). E.C.BATE-SMITH und N.H. LERNER ⁴⁸⁾ fanden bei ihren systematischen Untersuchungen die Leucoanthocyane hauptsächlich in niederen und primitiven Pflanzenfamilien. Familien, die als höher entwickelt innerhalb der einzelnen phylogenetischen Reihen gelten, bilden diese farblosen Verbindungen nicht. Daher sind sie der Auffassung,

⁴⁴⁾ E.W.UNDERHILL, J.E.WATKIN u. A.C.NEISH, *Canad.J.biochem. Physiol.* 35, 219 u. 229 (1957)

⁴⁵⁾ W.SEYFFERT, *Z.indukt.Abstammungs- u. Vererbungslehre* 87, 311 (1955)

⁴⁶⁾ I.STÖRMER u. H.v.WITSCH, *Planta* 27, 1-28 (1937)

⁴⁷⁾ W.SEYFFERT, *Z.indukt.Abstammungs- u. Vererbungslehre* 87, 311 (1955)

⁴⁸⁾ E.C.BATE-SMITH u. N.H.LERNER, *Biochem.J.* 58, 126 (1954)

daß die Leucoanthocyane als Produkte eines primitiven Stoffwechsels aufzufassen sind und daher auch nicht als Vorstufe der Anthocyane und Flavone in Frage kommen. Ein zwingender Beweis hierfür konnte noch nicht geliefert werden, da andererseits auch die Möglichkeit besteht, daß die höher entwickelten Pflanzen die Leucoanthocyane sofort und quantitativ in Anthocyane und Flavone umwandeln, so daß die Vorstufe nicht mehr erfaßt werden kann.

Durch unsere Untersuchungen über das Vorkommen von Phenylpropan-Verbindungen in der Petunia konnten wir außerdem die phenolischen Pflanzensäuren Kaffeesäure, Ferulasäure und mehrere Derivate dieser beiden Säuren und die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin nachweisen. Wenn wir die Kaffeesäure als Vorstufe für die Quercetinbildung und die Ferulasäure eventuell als Vorstufe für die Bildung der Methyläther des Delphinidins betrachten, so überrascht zunächst der ständige Anstieg der Kaffeesäurekonzentration im Laufe der Blütenentwicklung, bei gleichzeitigem Aufbau der Flavone und Anthocyane. Beobachten wir aber die Konzentrationsschwankungen der Säure S_6 (Kaffeesäure-Ferulasäure-Chinasäure-Glykosid), so ist zunächst ein Abbau dieser Verbindungen zu bemerken. Im Augenblick der größten Flavon- und Anthocyanbildung ist sie nicht mehr zu erfassen, und ihr Gehalt steigt erst wieder an, wenn die Hauptmasse der Flavonoide gebildet ist. Dagegen ist bei den flavon- und anthocyanfreien Blüten eine fast gleiche Konzentration dieser Verbindungen in allen Entwicklungsstadien zu erkennen. Die Säure S_6 ist eine Verbindung, in der wir Kaffeesäure, Ferulasäure und Zucker nachweisen konnte. Es ist daher durchaus möglich, daß die Petunia beim Aufbau der Flavonoide ihren Bedarf an Kaffeesäure und Ferulasäure und vielleicht auch an Zucker zunächst aus dieser Verbindung deckt und nicht die freien Säuren verwendet. Da offensichtlich eine Überproduktion von Kaffeesäure und Ferulasäure vorhanden ist, steigt auch die Konzentration dieser Säuren im Laufe der Entwicklungsperiode. Nach dem Untersuchungsergebnis mit den reinweißen Blüten ist es auch wahrscheinlich, daß die einfacheren Säuren im Laufe der Entwicklungsperiode erst stufenweise aus den Kaffee-Ferulasäure-Glykosiden und -estern gebildet werden. Sonst wäre der plötzliche Gehaltsabfall der Substanzen S_A und S_B beim gleichzeitigen Auftreten von S_3 und S_4 nicht zu erklären.

Das Fehlen der p-Cumarsäure und das Vorhandensein von Kämpferol in den Petunienblüten kann nur so erklärt werden, daß alle produzierte p-Cumarsäure sofort zum Aufbau des Kämpferols verbraucht wird, also kein Überangebot wie bei der Kaffeesäure besteht (siehe E.MÜLLER ⁴⁹).

Eine andere Überlegung wäre die, daß nicht Kaffeesäure und p-Cumarsäure die Bausteine für Quercetin und Kämpferol sind, sondern daß es andere Phenyl-

⁴⁹) E.MÜLLER, Dissertation, München 1957

propan-Verbindungen wie etwa Phenylalanin und Tyrosin sind. Für diese Hypothese würden die Tatsachen sprechen, daß wir in den kleinsten Knospen der flavon- und anthocyanhaltigen R.h. einen großen Gehalt an Phenylalanin und Tyrosin feststellen konnten, der im Laufe der Entwicklung abnahm, daß wir aber dagegen in den Knospen der flavon- und anthocyanfreien W.W. kein Phenylalanin und nur sehr wenig Tyrosin beobachteten.

Abschließend läßt sich sagen: ebenso wie A.J.BIRCH und Mitarbeiter⁵⁰⁾, E.W.UNDERHILL, J.E.WATKIN und A.C.NEISH⁵¹⁾ und T.A.GEISSMAN und Mitarbeiter^{52,53)} sind wir der Ansicht, daß die Bildung der Flavonoide über die Kondensation einer Phenylpropan-Verbindung mit einer anderen Komponente erfolgt. Ob diese Kondensation über ein Leucoanthocyan verläuft, konnte nicht nachgewiesen werden. Die Auffassung von I.STÖRMER und H.v.WITSCH⁵⁴⁾, daß Flavonole in Anthocyane umgewandelt werden, wurde durch unsere Versuche widerlegt.

Die Flavone und Anthocyane der *Petunia nana* wurden weitgehend aufgeklärt, ebenso die als biosynthetische Vorstufen in Frage kommenden phenolischen Carbonsäuren und Aminosäuren. Darüberhinaus konnten Aussagen über die quantitative Verteilung dieser Stoffe im Laufe einer Entwicklungsperiode der Blüte gemacht werden. Damit dürften die Grundlagen für die beabsichtigten Isotopen-Versuche geschaffen sein.

⁵⁰⁾ A.J.BIRCH u. Mitarbeiter, *Nature* (London) 172, 902 (1953)

⁵¹⁾ E.W.UNDERHILL, J.E.WATKIN u. A.C.NEISH, *Canad.J.biochem.Physiol.* 35, 219 u. 229 (1957)

⁵²⁾ T.A.GEISSMAN u. E.HINREINER, *Bot.Rev.* 18, 77 (1952)

⁵³⁾ T.A.GEISSMAN u. J.B.HARBORNE, *Arch.Biochem.Biophysics* 55, 447 (1955)

⁵⁴⁾ I.STÖRMER u. H.v.WITSCH, *Planta* 27, 1-28 (1937)

C. Experimenteller Teil

I. Anzucht der Pflanzen

Das teils aus eigenem Anbau, teils von Blumenzüchtereien stammende Samenmaterial wurde auf feuchtem Filtrierpapier in Petrischalen zur Keimung ausgelegt. Nach etwa 10 Tagen waren die Keimlinge so weit gediehen, daß sie vorsichtig in mit feingesiebter Erde gefüllte Pikierschalen übertragen werden konnten. Wenn die Pflänzchen die Größe von etwa 5 cm erreicht hatten, wurden sie in einzelne Töpfe umgesetzt. Im Frühjahr und Sommer begannen die Pflanzen etwa 2-3 Monate nach der Keimung die ersten Blüten zu entwickeln.

Für die Gewinnung einwandfreien Samenmaterials wurden in den einzelnen Blüten kurz nach dem Öffnen die Narben mit eigenem Pollen gründlich eingestäubt, wodurch in den meisten Fällen eine sehr reichliche Samenentwicklung erzielt wurde.

Lediglich bei dem Typ W.W. beobachteten wir eine wesentlich geringere Samenbildung, und in späteren Selbstungsgenerationen trat sogar totale Selbststerilität auf. Nur durch Kreuzbestäubung von Geschwisterpflanzen kam noch eine Kapselentwicklung zustande.

Von der Bestäubung bis zur Samenreife vergingen etwa 2 Monate. Die gewonnenen Samen erwiesen sich als sofort keimfähig, benötigten also keine längere Samenruhe.

Einige besonders kräftige Pflanzen konnten im Gewächshaus bis zu 3 Jahren, also über 2 Winter hinweg, mit großer Blühfreudigkeit am Leben erhalten werden.

II. Papierchromatographie

Alle papierchromatographischen Arbeiten wurden mit dem Papier 2043b Gl. ausgewaschen der Firma C.Schleicher und Schüll durchgeführt. Die Chromatogramme wurden in großen Glaskammern, die mit der Unterphase des Lösungsmittelsystems gesättigt waren, nach der absteigenden Methode entwickelt.

Folgende Lösungsmittelsysteme fanden Verwendung (die angegebenen Zahlenverhältnisse verstehen sich als Raumteile):

- a) Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (ÄAW) = 10+2+3

Anwendungsgebiete : Trennung der Flavonglykoside,
Anthocyane und phenolischen
Pflanzensäuren.

b) Butanol-Eisessig-Wasser (BEW) = 4+1+5

Anwendungsgebiete : Trennung der Flavonglykoside,
Flavonaglykone,
Anthocyane,
Anthocyanidine,
phenolischen Pflanzensäuren
und Aminosäuren.

c) Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (IAW) = 2+5+5

Anwendungsgebiet : Trennung der Flavonaglykone.

d) Pyridin-Äthylazetat-Wasser (PÄW) = 1+2+2

Anwendungsgebiet : Trennung der Zucker.

e) "Forestal-Gemisch" Eisessig-konz.Salzsäure-Wasser
(F) = 30+3+10

Anwendungsgebiet : Trennung der Anthocyanidine.

Als Sprühmittel zur Charakterisierung der Substanzen auf dem Chromatogramm kamen vor allem folgende Reagenzien zur Anwendung:

a) 5proz. wäßrige Aluminiumsulfatlösung

Anwendungsgebiete: Glykoside und Aglykone
der Flavone.

b) basisches Bleiazetat (Liqu.Plumbi subacetici DAB 6)

Anwendungsgebiete : Glykoside und Aglykone
der Flavone,
phenolische Pflanzensäuren.

c) 2proz. wäßrige Eisenchloridlösung

Anwendungsgebiet : Anthocyane.

Die getrockneten, mit Eisenchlorid besprühten Chromatogramme wurden bei Tageslicht, die mit Aluminiumsulfat oder basischem Bleiazetat entwickelten unter der Analysenquarzlampe betrachtet.

III. Herstellung eines Rohextraktes

Etwa 20 000-25 000 flavonhaltige Petunienblüten sammelten wir während einer Vegetationsperiode in einem mit Methanol gefüllten Gefäß. Diese Blüten wurden im Soxhlet erschöpfend extrahiert. Beim Erkalten fiel aus dem methanolischen Extrakt ein voluminöser, gelbgrüngefärbter Niederschlag von Ballaststoffen aus; er wurde abfiltriert. Nach dem Abdestillieren des Methanols auf etwa 100 ml digerierten wir nach Zusatz von destilliertem Wasser 1 Stunde

auf dem Wasserbad und filtrierten dann von abgeschiedenen Chlorophyll ab. Das restliche Chlorophyll wurde mit Chloroform ausgeschüttelt. Diesen vorgereinigten wäßrigen Extrakt schüttelten wir mit Äthylazetat bis zur Farblosigkeit der Oberphase aus. Der lehmfarbige Destillationsrückstand der vereinigten Äthylazetatausschüttelungen löste sich vollständig in Methanol.

IV. Reinigung und Trennung der Flavonglykoside durch Säulenchromatographie

Der methanolische Extrakt der Äthylazetatausschüttelungen wurde auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft, der Rückstand in heißem Wasser aufgenommen und filtriert. Dieser wäßrige Extrakt wurde zur Reinigung über eine Perlonsäule gegeben, die auf folgende Weise präpariert worden war:

Etwa 100 g Perlonpulver der Firma BASF (Ultramid K 228 BM 2) wurden mit Wasser zu einem dünnflüssigen Brei angeschwämmt und in eine Glassäule von 4 cm Durchmesser und 50 cm Höhe eingefüllt. Nach dem Absitzen des Perlonpulvers und dem Abtropfen des Wassers wurde die Säule zunächst noch mehrmals mit heißem Methanol und dann mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Mit einer Pipette wurde der Extrakt aufgetragen, und nachdem die Substanzen am Perlon adsorbiert waren, mit destilliertem Wasser so lange nachgewaschen bis alle wasserlöslichen Stoffe entfernt waren und das Waschwasser farblos ablief. Dann wurde mit Methanol eluiert und das Eluat fraktioniert aufgefangen.

Zur Auftrennung der Flavonglykoside verwendeten wir Glassäulen der gleichen Größen wie bei der Reinigung über Perlon. Zellulosepulver Nr. 125a, gewaschen, der Firma Schleicher und Schüll wurde mit wassergesättigtem Äthylazetat angeschlämmt und in die Säule gefüllt. Durch langsames Abtropfen der mobilen Phase erreichten wir ein gleichmäßiges Absetzen der Zellulose; dies ist unbedingt erforderlich, um einen guten Trenneffekt zu erzielen.

Die Fraktion aus der Perlonsäule, die die Flavonglykoside F_1 und F_2 und die Säuren S_1 und S_2 enthielt, wurde eingeengt und mit so viel Zellulosepulver versetzt, daß ein dicker Brei entstand. Diesen Brei erhitzen wir auf dem Wasserbad unter stetem Rühren bis zur Trockne. Das trockene Pulver rieben wir mit etwas wassergesättigtem Äthylazetat an, so daß eine plastische Masse entstand, und trugen diese in einer gleichmäßigen Schicht auf die Säule auf. Diese Substanzschicht wurde mit einer Lage Zellulosepulver bedeckt, um ein Aufwirbeln durch das auftropfende Lösungsmittel zu vermeiden. Die Trennung der Flavonglykoside konnten wir unter der UV-Lampe gut beobachten, eine Auftrennung der beiden Säuren gelang nicht.

Die Tropfgeschwindigkeit betrug sowohl bei der Perlonsäule, als auch bei der Zellulosesäule etwa 30 Tropfen in der Minute.

V. Identifizierung der Flavone

a) Eisenchlorid-Reaktion nach L.H.BRIGGS und R.H.LOCKER ⁵⁵⁾

Die schwach gelb gefärbten Flavonlösungen wurden mit einigen Tropfen einer 1proz. wäßrigen Ferrichloridlösung versetzt. Die grüne Farbe trat sofort auf. Zum Vergleich verwendeten wir eine Rutinlösung.

b) Hydrolyse

5 ml methanolische Flavonlösung wurden mit 5 ml 25proz. Salzsäure 2 Stunden über offener Flamme am Rückflußkühler hydrolysiert, der Alkohol abdampft und mit 20 ml Wasser verdünnt. Nach dem Erkalten schüttelten wir mehrmals mit 5 ml Äther aus, bis die organische Phase farblos blieb. Die aglykonhaltige Ätherausschüttelung wurde mit Wasser ausgewaschen, um die Säure zu entfernen, dann auf dem Wasserbad eingengt und chromatographiert.

c) Nachweis der Zucker

Zur Identifizierung der Zucker mußte die Hydrolysenlösung erst neutralisiert werden. Wir wählten hierfür den stark basischen Anionenaustauscher Dowex II ⁵⁶⁾ der Firma DOW, Chemical Company, Midland/Michigan. Das Harz wurde in eine Bürette geschlämmt und zunächst mit jeweils 200-300 ml Wasser, n-Natronlauge und n-Salzsäure gewaschen. Dann wurde es regeneriert und neutralisiert durch Spülen mit einer gesättigten Natriumbikarbonatlösung in 70proz. Äthanol bis zur alkalischen Reaktion und anschließendem Nachwaschen mit 70proz. Alkohol bis zur Neutralität. Auf die so vorbereitete Dowexsäule wurde die Hydrolysenlösung tropfenweise aufgetragen und mit ca. 5 ml 70proz. Äthanol nachgewaschen. Die abtropfende Lösung fingen wir in einem Schliffkolben auf, und von Zeit zu Zeit prüften wir auf Neutralität. Im Vakuum engten wir die Zuckerlösung bis auf 1 ml ein und trugen die neutralisierte Hydrolysenlösung mit authentischen Zuckern zum Vergleich auf Chromatogrammbögen auf.

Zur Entwicklung der Zuckerchromatogramme besprühten wir diese mit Anilinphthalatlösung (1,66 g o-Phthalsäure und 0,93 g Anilin in 100 ml wassergesättigtem Butanol). Die besprühten Chromatogramme wurden 15 Minuten bei 105°C getrocknet.

d) Anthronmethode nach R.DREYWOOD ⁵⁷⁾

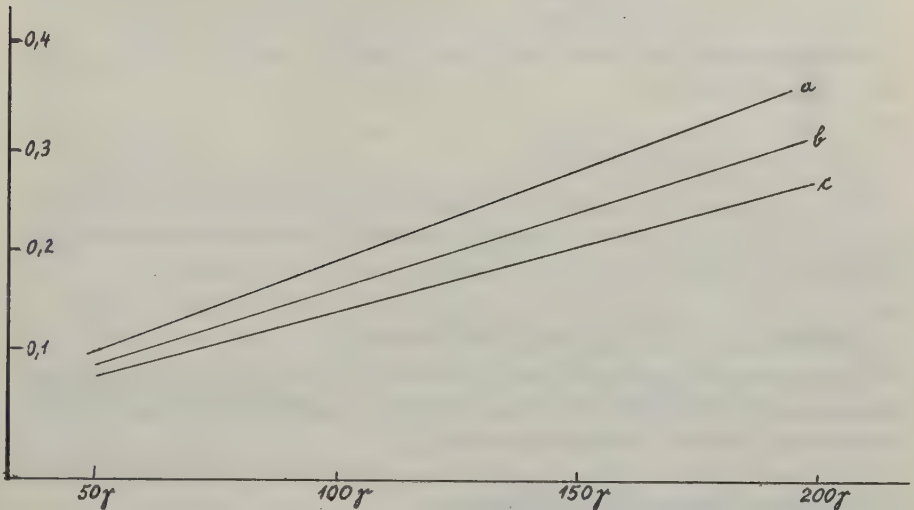
2 ml Flavonlösung wurden mit 2n-Schwefelsäure 2 Stunden auf dem Wasserbad hydrolysiert und nach dem Abkühlen mit Methanol auf 10 ml aufgefüllt. Der Gehalt an Aglykon wurde spektrophotometrisch bestimmt.

⁵⁵⁾ L.H.BRIGGS u. R.H.LOCKER, J.chem.Soc. (London) 3131 (1951)

⁵⁶⁾ K.A.PIETZ, E.B.TOOPER u. L.S.FODSICK, J.biol.Chemistry 194, 669 (1955)

2 ml methanolische Ausgangslösung wurden zur Trockne eingedampft und in 5 ml destilliertem Wasser gelöst, 10 ml einer 0.2proz. Anthronlösung in 96proz. Schwefelsäure hinzugefügt, vorsichtig gemischt und nach 15 Minuten gegen eine Blindprobe bei 620 ml spektrophotometrisch gemessen. Aus einer vorher aufgestellten Eichkurve konnten wir den Gehalt an Zucker in der untersuchten Glykolösung ablesen.

Abbildung 14



Zuckereichkurven

- | | |
|--------------|-----------------------|
| a) Glukose | c) arithm. Mittel aus |
| b) Galaktose | Glukose und Galaktose |

Das Verhältnis von Aglykon zu Zucker soll bei Diglykosiden etwa 1:1.15 sein, bei Monoglykosiden etwa 1:0.59. Wir erhielten als Mittelwert aus mehreren Messungen für Glykosid F₁ ein Verhältnis von 1:1.20 und für Glykosid F₂ ein Verhältnis von 1:1.05. Beide Substanzen müssen also Diglykoside sein.

⁵⁷⁾ R. DREYWOOD, Ind. Engng. Chem., analyt. Edit. 18, 499 (1946)

e) UV-Spektren und deren Verschiebungen

Für die Aufnahme der UV-Absorptionsspektren stellten wir uns 0.005-0.02proz. methanolische Substanzlösungen her. Alle Messungen, auch die mit Zusatz von Aluminiumchlorid, Natriumazetat, Borsäure-Natriumazetat und Aluminiumchlorid-Natriumazetat, wurden mit diesen Standardlösungen in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke mit dem Zeiss-Spektralphotometer M 4 Q durchgemessen.

Messungen mit Aluminiumchlorid

Zu 3 ml Standardlösung wurden 3 Tropfen einer 5proz. methanolischen Aluminiumchloridlösung (wasserfreies AlCl_3) zugesetzt. Die vorher fast farblose Flavonlösung nahm sofort einen tief gelben Farbton an, ließ sich aber ohne weitere Verdünnung messen.

Messung mit Natriumazetat

Etwa 5 ml der Lösung wurden mit frisch vorbereitetem wasserfreien Natriumazetat bis zur Sättigung im Reagenzglas geschüttelt. Nach kurzem Absitzen des überschüssigen Natriumazetats wurde filtriert und sofort gemessen.

Messung mit Aluminiumchlorid und Natriumazetat

5 ml Standardlösung wurden zuerst mit 3 Tropfen der 5proz. methanolischen Aluminiumchloridlösung versetzt, dann mit frisch geschmolzenem Natriumazetat gesättigt, filtriert und gleich gemessen.

Messung mit Borsäure und Natriumazetat

2 ml der Standardlösung wurden mit 2 ml einer gesättigten methanolischen Borsäurelösung versetzt, mit frisch vorbereitetem wasserfreien Natriumazetat bis zur Sättigung geschüttelt, nach dem Absitzen filtriert und gemessen.

VI. Identifizierung der Anthocyane

a) Bestimmung der Anthocyanidine

Französischer Rotwein enthält Malvidin, Petunidin und Delphinidin⁵⁸). Aus etwa 250 ml Rotwein wurde der Alkohol abdestilliert, der Rückstand mit 10 ml 25proz. Salzsäure 10 Minuten auf dem Wasserbad hydrolysiert und nach dem Erkalten filtriert. Aus diesem wäßrigen Extrakt schüttelten wir mit 3 x 5 ml Isoamylalkohol die Anthocyanidine aus. Die isoamylalkoholische Lösung wurde in

⁵⁸) P.DUPUY u. J.PUISAIS, C.R. hebd.Séances Acad.Sci. 240, 1802 (1955)

Streifen auf Chromatogrammbögen aufgetragen und diese im "Forestal-Gemisch" entwickelt. Durch Eluieren der Streifen mit Methanol erhielten wir die drei Anthocyanidine in Lösungen. An ihren R_f -Werten ließen sich leicht das Malvidin ($R_f = 0.6$), das Petunidin ($R_f = 0.46$) und das Delphinidin ($R_f = 0.3$) erkennen.

Aus einem wäßrigen Rohextrakt dunkelvioletter Petunienblüten wurden durch Ausschütteln mit Äthylazetat zunächst die Flavone entfernt, dann mit der gleichen Methode wie beim Rotwein zwei Anthocyanidine isoliert. Die erhaltenen methanolischen Anthocyanidinlösungen engten wir auf dem Wasserbad bis auf wenige ml ein und trugen sie punktförmig abwechselnd mit den authentischen Anthocyanidinen des Rotweins auf Chromatogrammbögen auf. Im BEW-Gemisch und im "Forestal-Gemisch" hatten die Anthocyanidine der Petunienblüten die gleichen R_f -Werte wie Malvidin und Petunidin.

b) Prüfung des Glykosidcharakters der Anthocyane

10-15 rotviolette Petunienblüten zerrieben wir in einer Reibschale, extrahierten mit ca. 10 ml 1proz. Salzsäure, filtrierten und schüttelten das Filtrat zur Entfernung der Flavonole mit 3 x 3 ml Äthylazetat aus. Die so gereinigte Lösung wurde mit Isoamylalkohol versehen und die Verteilung der Anthocyane zwischen den beiden Phasen ohne besondere Behandlung, nach Zugabe von Wasser und nach Zugabe einer gesättigten NaCl-Lösung beobachtet. Die Anthocyane der Petunienblüten zeigten das für Diglykoside typische Verhalten, d.h. sie gingen mit keiner der erwähnten Behandlungen in die Isoamylalkoholphase über.

VII. Prüfung auf Leukoanthocyane

Wir prüften unsere Petunienblüten auf Leukoanthocyane nach den von E.C. BATE-SMITH ⁵⁹⁾ ausgearbeiteten Verfahren, dem "Anthocyanidin-Test" und dem "Vanillin-Test". Zum Vergleich untersuchten wir Cyclamenblüten, in denen W.SEFFERT ⁶⁰⁾ Leukoanthocyane nachgewiesen hatte.

a) Anthocyanidin-Test

2 g frisches Blütenmaterial wurde mit 5 ml 2n Salzsäure 20 Minuten im Reagenzglas zum Sieden erhitzt, filtriert und das Filtrat mit 2 ml Isoamylalkohol geschüttelt. Bei den Cyclamenblüten färbte sich die Alkoholphase kräftig rot, bei den Petunienblüten blieb sie farblos.

b) Vanillin-Test

Etwa 2 g frische Blüten mazerierten wir mit ca. 5 ml Methanol 1 Minute im Reagenzglas. Aus dem dekantierten Extrakt wurde mit 2 x 2 ml Petroläther

⁵⁹⁾ E.C. BATE-SMITH, Biochem.J. 58, 122 (1954)

⁶⁰⁾ W. SEFFERT, Z. indukt. Abstammungs- u. Vererbungslehre 87, 311 (1955)

das Chlorophyll ausgeschüttelt, die methanolische Lösung in zwei Reagenzgläser geteilt, zu jeder Probe 3-5 Tropfen konz. Salzsäure und in ein Reagenzglas 3-5 Tropfen einer gesättigten Vanillinlösung zugegeben. Die Probe der Cyclamenblüten zeigte gegenüber der Kontrolle eine kräftige Vertiefung der Rotfärbung, während bei den Petunienblüten kein Unterschied zwischen der Kontrolle und dem Test-Beispiel zu erkennen war.

VIII. Isolierung und Identifizierung der phenolischen Carbonsäuren

Die Phenolischen Carbonsäuren isolierten wir durch die präparative Papierbogenmethode aus einem frischen Extrakt des flavon- und anthocyanfreien Petunientyps "WEISSE WOLKE". Aus etwa 250 Blüten wurde ein methanolischer Rohextrakt hergestellt und direkt in Streifen auf 10 Chromatogrammbögen aufgetragen. Die Chromatogramme entwickelten wir im ÄAW-Gemisch. Die Streifen mit den einzelnen Substanzen schnitten wir klein und füllten sie in einen 10 ml Soxhlet. Eluiert wurde zunächst 5 Minuten mit 15 ml kaltem Methanol, dann 1 Stunde mit heißem Methanol im Soxhlet auf dem Wasserbad. Die phenolischen Pflanzensäuren können bei längerem Stehen in alkoholischer Lösung teilweise verestern⁶¹⁾, daher verwendeten wir zur Messung der Absorptionsspektren und ihrer Verschiebung sofort die kalt hergestellten Eluate. Die Messungen wurden nach der gleichen Methode, wie bei den Flavonen beschrieben, durchgeführt.

a) Hydrolyse der phenolischen Carbonsäuren

5 ml des Soxhleteluats hydrolysierten wir 15 Minuten am Rückflußkühler auf dem Wasserbad mit 0.5 ml 25proz. Salzsäure. Die Lösung wurde ohne vorherige Neutralisation chromatographiert. Die Hydrolyse war vollständig.

b) Nachweis der Chinasäure

Die Chinasäure wurde nach der von R.NEU⁶²⁾ beschriebenen Methode nachgewiesen. Im Lösungsmittelsystem BEW hat die Chinasäure einen R_f -Wert von 0.19-0.22. Besprüht man das Chromatogramm mit einer 0.25proz. Morinlösung, so erscheint an dieser Stelle ein rotvioletter Fleck.

c) Molisch-Reaktion

2 ml einer wäßrigen Lösung wurden mit einigen Tropfen einer 20proz. alkoholischen Lösung von α -Naphthol versetzt, und diese Mischung mit konz. Schwefelsäure unterschichtet. Bei Gegenwart von Glykosiden trat ein blauer bis violetter Ring auf, dessen Farbe sich beim Schütteln über die ganze Flüssigkeit verbreitet⁶³⁾.

⁶¹⁾ A.GORIS u. H.CANAI, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 209, 125 (1939)

⁶²⁾ R.NEU, Naturwissenschaften 45, 286 (1958)

⁶³⁾ H.MOLISCH, Mh.Chem. 7, 198 (1886)

IX. Nachweis der Aminosäuren

Zum Nachweis der Aminosäuren trugen wir 0.2 ml methanolischen Rohextrakt punktförmig auf Chromatogrammbögen auf und entwickelten 50 Stunden im Lösungsmittelsystem BEW. Die Chromatogramme wurden mit einer 0.2proz. Ninhydrinlösung in 95% Butanol und 5% 2n Essigsäure besprüht und anschließend etwa 10 Minuten im Trockenschrank auf 105°C erwärmt. Zur Identifizierung dienten die stets mitlaufenden Vergleichssubstanzen.

X. Methode der quantitativen Messungen

Für die quantitativen, vergleichenden Untersuchungen wurden 1.0 g frische Blüten mit 10 ml Methanol über Nacht mazeriert. Dann extrahierten wir die Blüten etwa 2 Stunden in einem Soxhlet mit dem gleichen Methanol, filtrierten diesen Rohextrakt von den jetzt farblosen Blüten ab und füllten, wenn nötig, mit Methanol wieder auf 10 ml auf. 0.1 ml dieses Extraktes wurden auf gewaschenes Chromatographierpapier 2043b G1 der Firma Schleicher u. Schüll als Punkt aufgetragen. Die Startlinie war vom unteren Rand des Chromatogrammbogens 6 cm entfernt, der Abstand von Punkt zu Punkt betrug 5 cm. Als Lösungsmittelsystem verwendeten wir ÄAW, die Laufzeit betrug 7-8 Stunden.

Die getrockneten Chromatogramme wurden unter dem UV-Licht in 3.5 cm breite Streifen geschnitten. Dabei mußte genau darauf geachtet werden, daß die Substanzflecke in der Mitte des Streifens lagen. Diese Chromatogrammbänder spannten wir so in den Rahmen des Zusatzgeräts zum Spektralphotometer M 4 Q ein, daß die Messungen mit der Lösungsmittelfront begannen und der überstehende Teil des Streifens zu einer Rolle zusammengedreht werden konnte. Durch Verschieben des Lineals um jeweils 2 mm konnten wir das ganze Chromatogramm durchmustern und den am Anzeigegerät abgelesenen Wert des Durchlaßgrades unmittelbar am Lineal auf 20 x 15 cm große Millimeterpapierbögen aufzeichnen. Da der Rahmen nur 13 cm lang war, mußte der ca. 45 cm lange Chromatogramstreifen in vier Abschnitten durchgemessen werden. Die punktförmigen Eintragungen auf dem Millimeterpapier wurden durch Kurven miteinander verbunden und die vier Bögen Millimeterpapier an den Überschneidungszonen der Kurven zusammengeklebt. An den Stellen des geringsten Durchlaßgrades, der stets mit der Lage der Substanzflecke auf dem Chromatogramm übereinstimmte, konstruierten wir Gauss'sche Glockenkurven. Diese Glocken wurden planimetrisch gemessen mit dem OTT-PLANIMETER Typ 10 der Firma OTT, Kempten/Bayern.

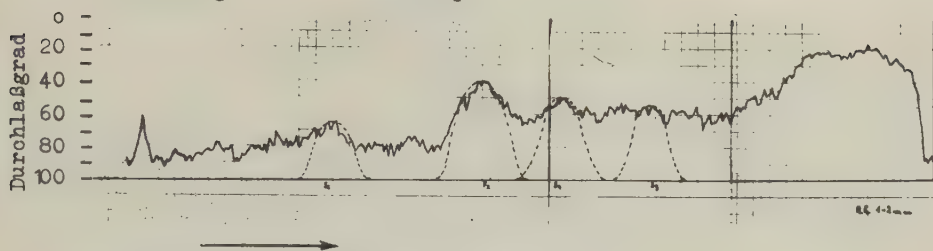
Alle quantitativen Messungen führten wir bei einer Wellenlänge von 328 mμ und einer Lichtverstärkung III durch. Den Nullpunkt stellten wir von Zeit zu Zeit an einer bestimmten Stelle eines Chromatogramstreifens ein, der wohl im

selben Lösungsmittelsystem unter den gleichen Bedingungen entwickelt worden war, aber keine Substanz enthielt.

Für die Messungen der 1 mm großen Knospen standen uns nur 0.2 bzw. 0.5 g Material zur Verfügung. Der Extrakt wurde, auf die gleiche Weise wie oben beschrieben, mit 10 ml Methanol hergestellt, vor dem Chromatographieren engten wir jedoch auf 2 bzw. 5 ml ein, so daß stets die gleichen Konzentrationen vorlagen.

Die Abbildungen 15-30 zeigen die Kurven der R.h.- und der W.W.-Knospen in 8 verschiedenen Entwicklungsstadien.

Abbildung 15 R.h.-Knospen von 1-2 mm



Laufrichtung des Chromatogramstreifens

Abbildung 16 R.h.-Knospen von 3-5 mm

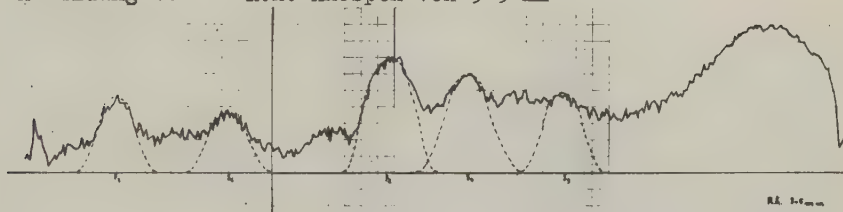


Abbildung 17 R.h.-Knospen von 5-10 mm

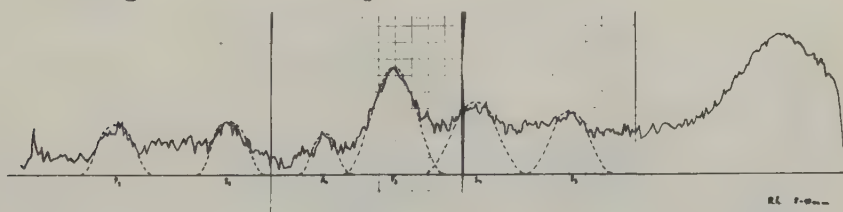
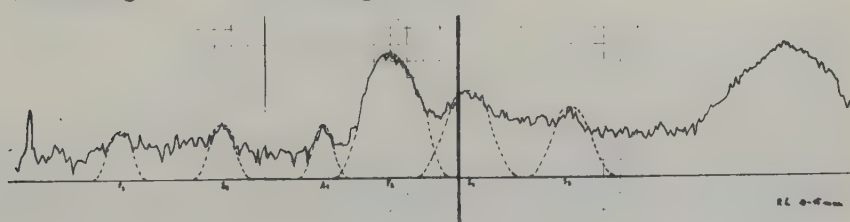


Abbildung 18 R.h.-Knospen von 10-15 mm



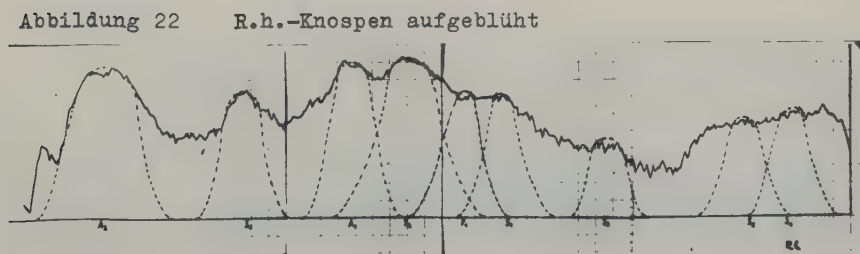
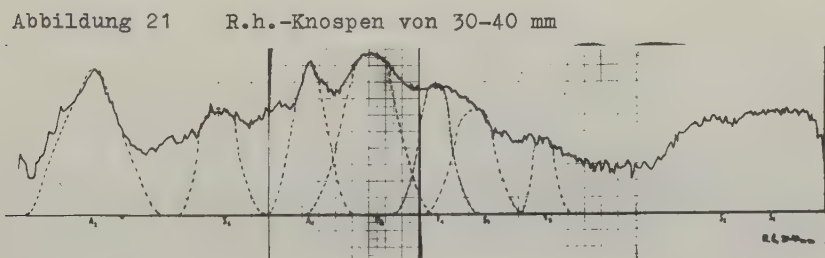
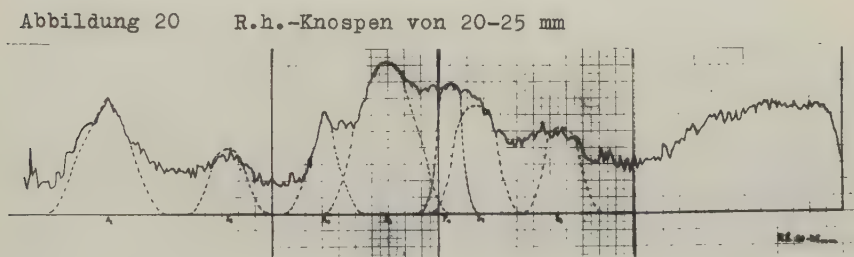
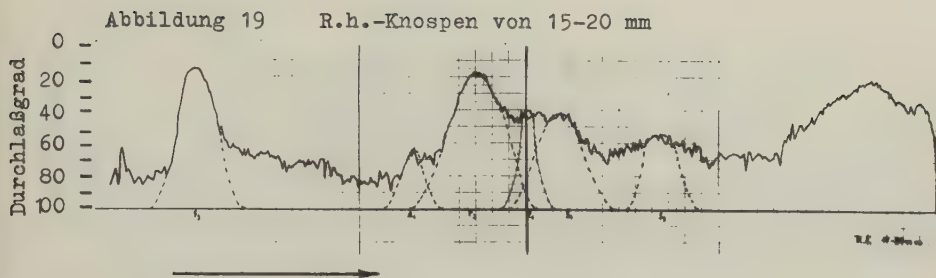
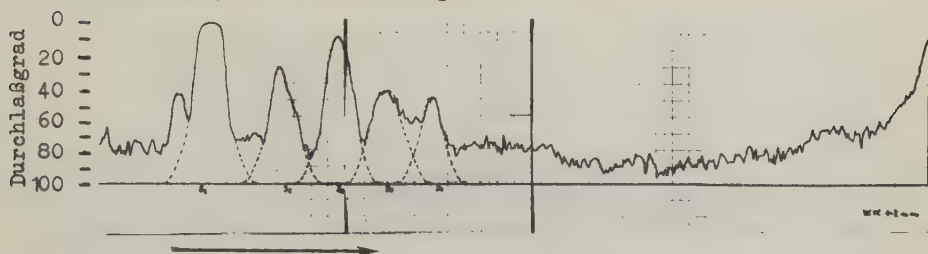


Abbildung 23 W.W.-Knospen von 1-2 mm



Laufrichtung des Chromatogrammstreifens

Abbildung 24 W.W.-Knospen von 3-5 mm

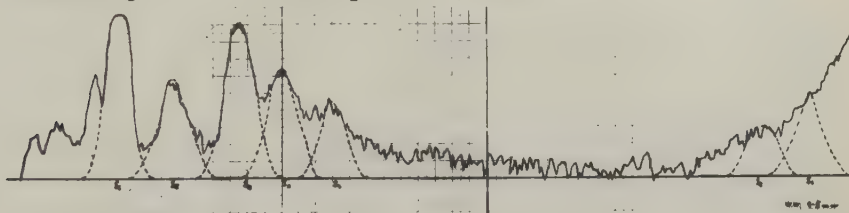


Abbildung 25 W.W.-Knospen von 5-10 mm

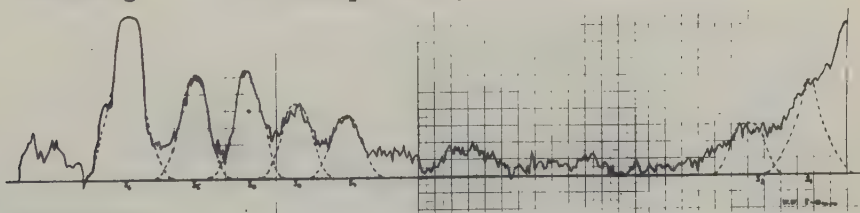


Abbildung 26 W.W.-Knospen von 10-15 mm

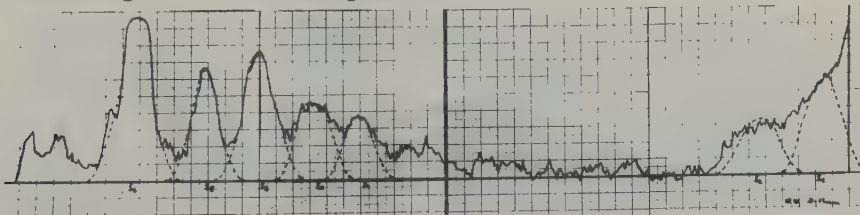
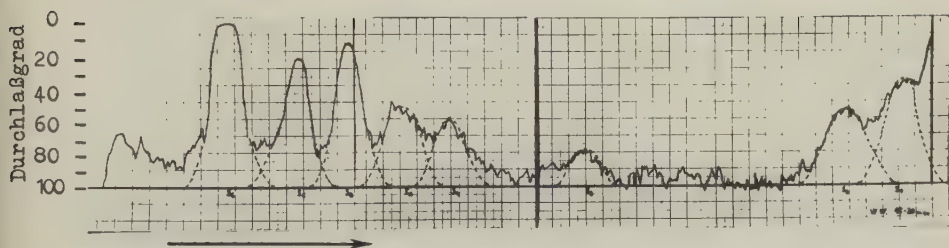


Abbildung 27

W.W.-Knospen von 15-20 mm



Laufrichtung des Chromatogramstreifens

Abbildung 28

W.W.-Knospen von 20-25 mm

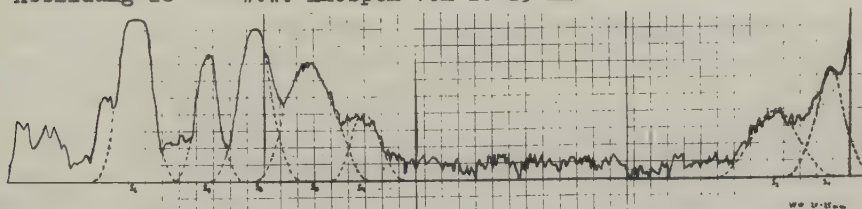


Abbildung 29

W.W.-Knospen von 30-40 mm

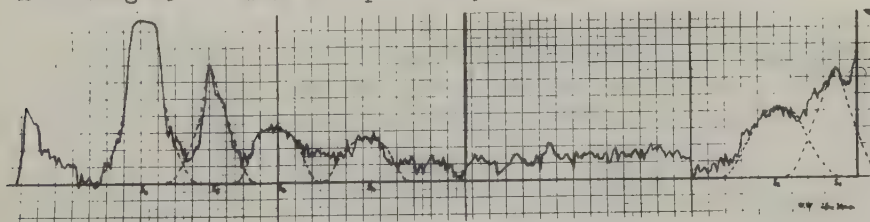
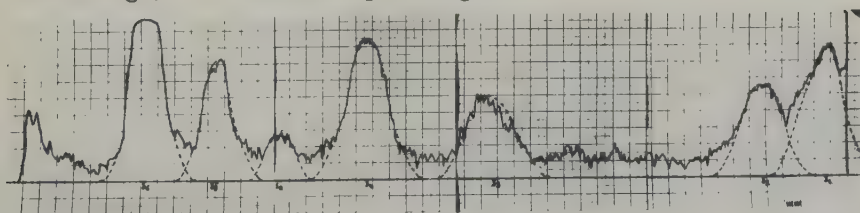


Abbildung 30

W.W.-Knospen aufgeblüht.



Lebenslauf

Am 17. August 1927 wurde ich als Sohn des Apothekers Edmund Groll und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Hambach in Kassel geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Gudensberg, Bezirk Kassel, trat ich in die Oberschule in Fritzlar ein. Vom September 1943 bis Oktober 1944 war ich als Luftwaffenhelfer eingesetzt. Nach Ableistung des Reichsarbeitsdienstes wurde ich zur Wehrmacht einberufen und Ende 1945 aus amerikanischer Kriegsgefangenschaft entlassen. Im Sommer 1948 legte ich die Reifeprüfung am Realgymnasium I in Kassel ab.

In der priv. Löwenapotheke in Grebenstein praktizierte ich zwei Jahre und bestand im September 1950 das pharmazeutische Vorexamen in Kassel. Nach halbjähriger Tätigkeit als Vorexaminierter begann ich an der phil.-theol. Hochschule in Passau mit dem Pharmaziestudium, das ich vom dritten Semester ab in München fortsetzte, und legte im Dezember 1955 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Staatsexamen ab.

Im Mai 1956 begann ich mit der Ausarbeitung der vorliegenden Untersuchungen am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer.

